(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2004-128 (P2004-128A)

(43) 公開日 平成16年1月8日 (2004.1.8)

			• •		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
(51) Int.C1. ⁷	FI			テーマコー	ド (参考)
C12Q 1/68	C12Q	1/68	ZNAA	4BO24	
C12N 15/09	C12Q	1/02		4B063	
C 1 2 Q 1/02	C12Q	1/42			
C12Q 1/42	C12Q	1/44			
C12Q 1/44	GO1N	33/53	D		
	審査請求 未	請求 請求項	頁の数 17 O L	(全 98 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号 (22) 出願日 (31) 優先權主張番号 (32) 優先日 (33) 優先權主張国	特願2002-331107 (P2002-331107) 平成14年11月14日 (2002.11.14) 特願2002-103495 (P2002-103495) 平成14年4月5日 (2002.4.5) 日本国 (JP)	(71) 出願人 (74) 代理人 (72) 発明者 (72) 発明者 Fターム (多	科学技術振興 埼玉県川口市 100080034 弁理士 原 間 岡 剛史 岡山県岡山市 号	本町4丁目1番 搬三 車島中1丁目4 門田屋敷2丁目	番2-304
				ฎ	長終頁に続く

(54) 【発明の名称】造血器腫瘍細胞検出方法および造血器腫瘍細胞検出キット

(57)【要約】

【課題】分子生物学的知見を利用して、造血器腫瘍細胞の高感度かつ高特異的に検出する造血器腫瘍細胞検出方法および検出キットを提供する。

【解決手段】造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質を定量するとともに、上記検体試料から得られるSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認する。これによって、一つの遺伝情報により造血器腫瘍細胞の有無を2段階で確認するため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (1) 造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認するSHP1遺伝子メチル化確認工程、
- (2) 上記検体試料から得られるSHP1蛋白質およびSHP1mRNAの少なくとも一方の発現量を定量するSHP1遺伝子産物定量工程、および、
- (3)上記検体試料に含まれるSHP1遺伝子の異型接合性喪失(LOH)の有無を確認するSHP1遺伝子LOH確認工程、
- の少なくとも何れかを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項2】

上記SHP1遺伝子メチル化確認工程には、

上記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素で処理する遺伝子切断試行段階と、

上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子に対して、上記SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を実施する遺伝子増幅試行段階と、

増幅された特定のサイズの遺伝子の量を確認する遺伝子増幅量確認段階とが含まれることを特徴とする請求項1に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項3】

上記プライマーが、さらに、配列番号1または2に示す塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項2に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項4】

上記遺伝子増幅量確認段階では、電気泳動法を用いて特定サイズの遺伝子の量を確認することを特徴とする請求項2または3に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項5】

上記遺伝子切断試行段階では、制限酵素として、メチル化感受性制限酵素を用いることを特徴とする請求項2、3または4に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項6】

上記SHP1遺伝子メチル化確認工程には、

上記検体試料から得られる遺伝子試料を、重亜硫酸塩で処理する遺伝子修飾段階と、重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、SHP1遺伝子の塩基配列中のメチル化シトシンの有無を判定するメチル化シトシン含有判定段階とが含まれることを特徴とする請求項1に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項7】

上記メチル化シトシン含有判定段階では、PCRによりメチル化シトシンを検出する方法、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、またはメチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法のうち、少なくとも何れかが用いられることを特徴と 40 する請求項 6 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項8】

上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩として、重亜硫酸ナトリウムが用いられることを特徴とする請求項 6 または 7 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項9】

上記SHP1遺伝子産物定量工程では、SHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体を用いてSHP1蛋白質を定量することを特徴とする請求項1ないし8の何れか1項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項10】

上記SHP1遺伝子産物定量工程では、酵素抗体法またはウエスタンブロッティング法に 50

10

20

よりSHP1蛋白質が定量されることを特徴とする請求項9に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項11】

上記SHP1遺伝子産物定量工程では、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部を検出するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出することにより、SHP1mRNAを定量することを特徴とする請求項1ないし8の何れか1項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項12】

上記SHP1遺伝子産物定量工程では、ノーザンブロッティング法、逆転写PCR法、リアルタイムPCR法、またはRNA in situハイブリダイゼーション法によりS 10 HP1遺伝子のmRNAの発現が検出されることを特徴とする請求項11に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項13】

異型接合性喪失の有無の確認は、上記SHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカーの少なくとも一方、または、上記SHP遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型のような遺伝子多型を、PCRを用いたフラグメント解析により実施されることを特徴とする請求項1ないし12の何れか1項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項14】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

- (1) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質を抗原と 20 するSHP1抗体、および
- (2) シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、

SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅するPCR用のプライマーと、上記SHP1遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照DNAとのうち、少なくとも一方を含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。

【請求項15】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

- (1) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体、
- (2) 遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および
- (3) 配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。

【請求項16】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカーの少なくとも一方の全長またはその一部を検出するPC 40 R用のプライマーを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。

【請求項17】

さらに、 P C R 用 試薬、 および、 制 限 酵素 反 応 用 試薬 の 少 な く と も 一 方 を 含 む こ と を 特 徴 と す る 請 求 項 1 4 、 1 5 ま た は 1 6 に 記 載 の 造 血 器 腫 瘍 細 胞 検 出 キ ッ ト 。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】

本発明は、造血器腫瘍細胞検出方法および該検出方法に好適に用いられる造血器腫瘍細胞検出キットに関するものであり、特に、例えば、悪性リンパ腫や白血病等に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子産物の発現減少あるいは消失またはこれを 50

コードする S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することによって、 造血器 腫瘍 細胞を高感度 かつ 高特 異的に検出できる検出方法および検出キットに関するものである。

[0002]

【従来の技術】

ヒト(Homo sapiens)における悪性リンパ腫や白血病等の造血器腫瘍(血液系の腫瘍)には、難治性で極めて予後の悪いものから比較的予後のよいものまで様々な種類が知られている。この造血器腫瘍の治療には、各種化学療法や放射線療法、あるいは免疫療法といった種々の療法がすでに実用化されているが、このような治療の結果、ほぼ腫瘍細胞が退縮したとしても、わずかに腫瘍細胞が生存していれば造血器腫瘍の再発は免れない。

[0003]

上記造血器腫瘍の診断は、従来では、複数の診断手法を併用することにより総合的に実施されている。具体的には、末梢血や各種生検材料を用いて、組織染色や免疫染色等による形態学的な観察や組織学的な観察が実施されたり、さらには、種々の分子生物学的解析や染色体解析等も実施されたりしている。また、上記造血器腫瘍の診断では、判定までにかなりの時間を要する。

[0004]

【発明が解決しようとする課題】

上記従来の各診断手法は、それ単独では造血器腫瘍細胞を高感度、高特異的、かつ迅速に検出できるものではない。それゆえ、これら従来の診断手法では、複数を併用して総合的 20 に判断しなければ造血器腫瘍を診断することができない。

[0005]

つまり、従来の診断手法を使用する限り、複数の診断手法を併用しなければならないため、診断の煩雑化を招くだけでなく時間がかかり、造血器腫瘍細胞検出感度も特異性も高くないことから、医師の専門的な判断が診断に大きな比重を占めることになる。そのため、従来では、造血器腫瘍の診断技術は、実質的に医療現場での利用に限られており、各々の疾患者には対応できるが、集団検診による造血器腫瘍の早期発見・早期治療を目的としては利用されていない。

[0006]

造血器腫瘍細胞をより高感度かつ高特異的に実施するには、造血器腫瘍細胞に特異的であり、かつ広い範囲の造血器腫瘍に見られる感度の高いマーカーを用いることが考えられる。このようなマーカーを用いれば、造血器腫瘍の早期発見・診断を容易かつ迅速に実施することができ、医療上、悪性リンパ腫や白血病等の早期治療や再発予防に応用することが可能となるだけでなく、臨床検査産業や医薬品産業等にも利用可能な診断技術とすることができ、産業の発展に寄与することが可能となる。しかしながら、このようなマーカーは現在までのところ知られていない。

[0007]

本発明は上記課題に鑑みなされたものであって、その目的は、分子生物学的知見を利用して、迅速且つ簡便に造血器腫瘍細胞を高感度かつ高特異的に微量の患者検体から検出し造血器腫瘍の早期発見・診断および早期治療を容易にし、集団検診にも適用可能な造血器腫 40 瘍細胞検出方法および検出キットを提供することにある。

[0008]

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、広い範囲の悪性の造血器腫瘍では、プロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質の発現抑制が極めて高頻度で見られ、しかも悪性度の高い造血器腫瘍において、上記SHP1蛋白質の発現抑制の傾向が強くなることを見出し、SHP1遺伝子産物およびこれをコードするSHP1遺伝子の双方をマーカーとして用いることで、造血器腫瘍細胞の高感度、高特異的、かつ短時間に検出でき、かつ産業上利用できる造血器腫瘍細胞検出技術を実現し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

[0009]

すなわち、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法は、上記の課題を解決するために、(1)造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質およびSHP1mRNAの少なくとも一方の発現量を定量するSHP1遺伝子産物定量工程、(2)上記検体試料から得られる、SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認するSHP1遺伝子メチル化確認工程、および(3)上記検体試料に含まれるSHP1遺伝子の異型接合性喪失(LOH)の有無を確認するSHP1遺伝子LOH確認工程、の少なくとも一方を含むことを特徴としている。

[0010]

上記SHP1遺伝子産物の発現抑制は、悪性の造血器腫瘍細胞に極めて高頻度で見られるのに対し、正常な血液細胞にはこの現象が見られない。また、上記SHP1蛋白質の発現抑制は、SHP1遺伝子のメチル化によるものである。さらに、DNAメチル化によるSHP1遺伝子の転写抑制の前後には、SHP1遺伝子の一つの対立遺伝子が喪失している

[0011]

上記方法によれば、上記知見を利用して、検体試料から得られるSHP1遺伝子のメチル化を確認し、造血器腫瘍細胞の存在を検出することで、悪性の造血器腫瘍細胞の存在の有無をスクリーニングし、一方検体試料中のSHP1遺伝子産物、具体的にはSHP1蛋白質、またはSHP1mRNA、あるいはその両方の発現を定量する。

[0012]

すなわち、上記方法では、SHP1遺伝子の不活性化を、遺伝子DNAの修飾とmRNAと蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカーを用いて判定できることになる。すなわち、SHP1遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を4段階で確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

[0013]

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましい一例としては、上記SHP1遺伝子メチル化確認工程に、上記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素で処理する遺伝子切断試行段階と、上記メチル化感受性 30制限酵素で処理された遺伝子に対して、上記SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いてPCR法を実施する遺伝子増幅試行段階と、増幅された特定のサイズの遺伝子の量を確認する遺伝子増幅量確認段階とが含まれる検出方法を挙げることができる。

[0014]

上記方法によれば、メチル化感受性制限酵素を用いて検体試料から得られた遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の切断を試みることでメチル化の有無を区別し、さらにPCRを用いて増幅してから、得られる特定サイズのPCR産物の量を確認する。それゆえ、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても 40 高い検出感度で、しかも高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0015]

上記検出方法においては、上記プライマーが、さらに、配列番号 1 または 2 に示す塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであることが好ましい。

[0016]

また、上記検出方法においては、上記遺伝子増幅量確認段階では、電気泳動法を用いて特定サイズの遺伝子の量を確認することが好ましい。

[0017]

さらに、上記検出方法においては、上記遺伝子切断試行段階では、メチル化感受性制限酵 50

素として、同一の塩基配列を認識するメチル化非感受性制限酵素が知られている制限酵素を用いることが好ましい。

[0018]

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましい他の一例としては、上記SHP1遺伝子メチル化確認工程に、上記検体試料から得られる遺伝子試料を、重亜硫酸塩で処理する遺伝子修飾段階と、重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、SHP1遺伝子の塩基配列中のメチル化シトシンの有無を判定するメチル化シトシン含有判定段階とが含まれる検出方法を挙げることができる。

[0019]

上記方法によれば、重亜硫酸塩を用いて検体試料から得られた遺伝子試料を処理すると、塩基配列中のシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されない。そのため、遺伝子修飾段階後のSHP1遺伝子の塩基配列中にシトシンが含まれるか否かを判定するのみで、SHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0020]

上記検出方法においては、上記メチル化シトシン含有判定段階では、PCRによりメチル化シトシンを検出する方法、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、またはメチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法による遺伝子の処理のうち、少なくとも何れかが用いられても好ましい。

[0021]

上記方法によれば、少なくともPCRを用いることで、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0022]

上記検出方法においては、上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩として、重亜硫酸ナトリウムが用いられることが好ましい。また、上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩とともに尿素が併用されてもよい。

[0023]

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法においては、上記何れの例の検出方法であっても 30、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、SHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体を用いてSHP1蛋白質を定量すると好ましい。具体的には、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、酵素抗体法(免疫組織化学法、免疫細胞化学法、ELISA(enzyme-1inked immunosorbent assay)法)またはウエスタンプロッティング法によりSHP1蛋白質が定量されると好ましい。

[0024]

上記方法によれば、抗原抗体反応を利用してSHP1蛋白質を定量することになるので、 簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0025]

あるいは、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法においては、上記何れの例の検出方法 40であっても、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、配列番号3に示すSHP1遺伝子 c DNAの塩基配列の全長またはその一部を検出するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出することにより、SHP1mRNAを定量しても好ましい。具体的には、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、ノーザンプロッティング法、逆転写PCR法、リアルタイム逆転写PCR法、またはRNA in situハイブリダイゼーション法によりSHP1遺伝子のmRNAの発現が検出されると好ましい。

[0026]

上記方法によれば、SHP1遺伝子産物としてSHP1遺伝子のmRNAによりSHP1 遺伝子産物を定量することになるので、SHP1遺伝子のcDNAと相同性を有するオリ ゴペプタイドをプローブやプライマーとして利用することで、簡素なメカニズムで高特異 50 的かつ高感度に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0027]

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましいさらに他の一例としては、異型接合性 要失の有無の確認は、上記SHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカ 一の少なくとも一方、または、上記SHP1遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多 型のような遺伝子多型を、PCRを用いたフラグメント解析することにより実施される方 法を挙げることができる。このとき用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料で あればよい。また、対照としては、血液学的完全寛解後に得られる検体を用いてもよいし 、他の正常組織細胞を用いてもよい。

[0028]

上記の方法によれば、マイクロサテライト・マーカーまたは単一塩基多型(SNP)等の遺伝子多型の異型接合性喪失をPCRにより確認することによって、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認しているので、簡素なメカニズムでより確実に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0029]

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、(1)造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体、および、(2)シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増 20幅するPCR用のプライマーと、上記SHP1遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照DNAとのうち、少なくとも一方を含む構成を挙げることができる。

[0030]

あるいは、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい他の一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、(1)上記SHP1抗体、および(2)遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および、(3)配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を持つPCR用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含む構成を挙げることができる。

[0031]

さらには、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましいさらに他の一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカーの少なくとも一方の全長またはその一部を検出するPCR用のプライマーを含む構成を挙げることができる。

[0032]

上記造血器腫瘍細胞検出キットにおいては、さらに、PCR用試薬、および、制限酵素反応用試薬の少なくとも一方を含むことが好ましい。

[0033]

上記何れの構成であっても、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい 薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかか る造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ迅速に実施することができ、本発明を臨床検査産業 や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

[0034]

【発明の実施の形態】

〔実施の形態1〕

本発明における実施の一形態について図 1 ないし図 2 4 に基づいて説明すれば以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

[0035]

10

30

40

本発明は、造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロモーターからのプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子産物すなわちSHP1蛋白質とmRNAとを定量するとともに、上記検体試料から得られる、SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認することで、上記検体試料中から造血器腫瘍細胞を検出する技術である。

[0036]

本発明で、造血器腫瘍細胞を検出するためのマーカーとして用いられるSHP1遺伝子は、染色体12p13に存在し、図1~図10および配列番号1に示す塩基配列をゲノムDNA(ワイルドタイプ)のセンス鎖とし、図11~図20および配列番号2に示す塩基配列をアンチセンス鎖とする16のエキソン(図および配列表中大文字で示す領域)を有す 10る遺伝子である。そのcDNAは、図21および配列番号3に示す塩基配列を有する約1.8kbのサイズを有している。なお、SHP1遺伝子はSH-PTP1,PTP1C、HCP、HCPH、PTPN6、HPTP1C、SHP-1Lと同一の遺伝子である。

[0037]

上記SHP1遺伝子にコードされているSHP1蛋白質は、分子量68kDで、各種造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ(PTPase)であり、図22に示すように、N末端側にタンデム構造となる2つのSH2(Src homologydomain 2)領域(270アミノ酸残基)と、246アミノ酸残基のPTPaseドメインと、93アミノ酸残基のC末端側領域とを有する構造となっている。また、図23および配列番号4に示すアミノ酸配列を有している。

[0038]

ヒトの造血器腫瘍、例えば悪性リンパ腫や白血病では、多くの種類で90%以上の高い頻度でSHP1蛋白質の強い発現抑制が見られる(例えば、American Journal of Pathology, Vol.159, No.4, October 2001:1495-1505等参照)。このように悪性の造血器腫瘍細胞では、上記SHP1蛋白質の発現抑制が極めて高頻度で見られるのに対し、正常な血液細胞にはこの現象が見られない。

[0039]

本発明者らは、上記SHP1蛋白質の発現抑制が、上記SHP1遺伝子がメチル化されることによる転写異常を原因とすることを独自に見出した。

[0040]

例えば、図24に示すように、図1~図10および配列番号1に示すゲノムDNA(ワイルドタイプ)のセンス鎖(181塩基~2160塩基まで例示)において、1001塩基~1163塩基のエキソン(図中大文字)の前にプロモーター領域が存在するが、この近傍にシトシン(C)とグアニン(G)とが並ぶCG配列が多く存在しCpG島(CpGisland)を形成している(図24中ではCG配列を太字の網掛けで示す)。正常な造血器細胞では、このCpG島のシトシンはメチル化されていないが、例えば悪性のリンパ腫細胞では、上記CG配列のシトシンの多くがメチル化されている。勿論、このCG配列におけるシトシンのメチル化はセンス鎖のみならずアンチセンス鎖にも同じように生じる。

[0041]

上記 C p G 島における C G 配列の高度なメチル化は、 S H P 1 遺伝子の D N A から m R N A の 転写を 阻害し、その結果、 S H P 1 蛋白質の生産が抑制される。この現象は、上述したように 造血器 腫瘍細胞では極めて高頻度に見られる。しかも、各種 造血器 腫瘍 患者の完全 寛解期には、 S H P 1 遺伝子における D N A のメチル化が完全に消失し、 分子生物学上の知見と 臨床上の知見との間に非常に高い相関関係が見られる。それゆえ、メチル化による S H P 1 遺伝子の発現抑制が、造血器 腫瘍細胞の発症機構の中で重要な役割を果たしていることが推測される。そこで本発明では、上記 S H P 1 遺伝子の発現抑制という現象を、造血器 腫瘍細胞のマーカーとして利用する。

[0042]

20

30

さらに、本発明者らは、悪性リンパ腫や白血病等の疾患が発症する際に、上述した、DNAメチル化によってSHP1遺伝子の転写抑制が生じる前後に、SHP1遺伝子の一つの対立遺伝子が喪失することも独自に見出した。そこで、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認することによって、SHP1遺伝子の対立遺伝子の喪失を確認することが可能となる。それゆえ、SHP1遺伝子の異型接合性喪失も造血器腫瘍細胞のマーカーとして利用することができる。

[0043]

悪性リンパ腫や白血病において、SHP1遺伝子には、高頻度のDNAメチル化、高頻度の異型接合性喪失、SHP1遺伝子の発現の低下または消失が検出され、さらには、外来SHP1遺伝子導入が血球系の細胞の増殖を抑制する傾向にある。これにより、SHP1 10遺伝子が癌抑制遺伝子の一つであることが強く示唆される。

[0044]

そこで、本発明では、SHP1遺伝子メチル化確認工程で、上記検体試料から得られるSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認し、SHP1遺伝子産物定量工程にて、造血器細胞を含む検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびmRNAの少なくとも一方を定量し、さらに、SHP1遺伝子LOH確認工程で、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認するという三つの工程を利用する。これら工程は単独で用いられても良いし、双方ともに用いられても良い。さらに、SHP1遺伝子産物定量工程では、SHP1蛋白質のみ定量されても良いし、SHP1mRNAのみ検出されても良いし、双方ともに検出されてもよい。

[0045]

これによって、例えば、まず、検体試料中のSHP1遺伝子のメチル化を検出することでスクリーニングし、その後、検体試料のSHP1遺伝子産物の発現をSHP1mRNAおよびSHP1蛋白質の少なくとも一方で定量することで、悪性の造血器腫瘍細胞の有無を確認することで造血器腫瘍細胞の存在を確定するという検出プロセスを実施することができる。

[0046]

したがって、本発明では、SHP1遺伝子の発現を、遺伝子DNAの修飾とmRNAと蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカーを用いて判定できることになる。すなわち、SHP1遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を3段階で30確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる

[0047]

また、上述したように、本発明におけるSHP1遺伝子を導入することで、血球系の細胞の増殖を抑制する傾向にあることも確認されている。それゆえ、SHP1遺伝子は、遺伝子治療に用いることも可能であり、例えば、腫瘍細胞にSHP1遺伝子の発現ベクターをトランスフェクトすることにより、腫瘍細胞の増殖を抑制することが期待できる。

[0048]

本発明で用いられる検体試料は、末梢血あるいは骨髄液等の造血器細胞を含む検体試料であればどのような検体試料であっても特に限定されるものではない。本発明における造血 40 器細胞とは、各種血液細胞を含むが、特に好ましくは各種白血球が挙げられる。より具体的には、リンパ球(T細胞・B細胞)、顆粒球(好中球、好酸球、好塩基球)、単球並びにマクロファージ、マスト細胞、ナチュラルキラー細胞等を挙げることができる。あるいは造血幹細胞やリンパ球幹細胞であってもよい。

[0049]

したがって、本発明で用いられる検体試料には、上記造血器細胞が含まれている血液や骨髄液あるいは体液等をヒトから採取し、これをそのまま検体試料として用いてもよいし、採取した血液や体液に対して従来公知の処理を施すことによって、分子生物学的な分析を実施し易い分析用検体試料としてもよい。

[0050]

50

本発明が適用可能な造血器腫瘍としては、具体的には、例えば、慢性骨髄性白血病、フィ ラデルフィア染色体ポジティブ (+ (9 ; 2 2) (q q 3 4 ; q 1 1) , B C R / A B L)慢性骨髓性白血病、慢性好中球白血病、慢性好酸球白血病/高好酸球症候群、慢性突発 性骨髄繊維症、真性多血症、本態性血小板増加症、その他分類できない骨髄増殖性疾患等 の各種骨髄増殖性疾患;

慢性骨髄性単球白血病、非定型慢性骨髄性白血病、幼年性骨髄性単球白血病等の骨髄異型 性/骨髓增殖性疾患;

環状鉄芽球を伴う難治性貧血、環状鉄芽球を伴わない難治性貧血、多系列異形成を伴う難 治性血球減少症(骨髄異型性症候群)、過剰芽球5Q-症候群を伴う難治性貧血(骨髄異 型性症候群)、その他分類できない骨髄異型性症候群等の骨髄異型性症候群;

再発性細胞遺伝学的転座を伴う急性骨髄性白血病(AML)(例えば、+(8;21)(q 2 2 ; q 2 2) を伴う A M L 、 A M L 1 (C B F - α) / E T O 、 急性前骨髄性白血病 (+ (15;17) (q22;q11-12) を伴うAMLおよびその変形、PML/R $AR-\alpha$))、異常な骨髄好酸球(inv(16)(p13q22)あるいは+(16; 16) (p13; q11)、CBF β / MYH11X) を伴うAML、11q23 (ML L)異常を伴うAML、前骨髄異型性症候群を伴いかつ多系列異形成を伴うAML、前骨 髄異型性症候群を伴いかつ多系列異形成を伴わないAML、治療に関係するAMLおよび 骨髄異型性症候群(アルキル化剤に関係する治療、エピポドフィロトキシンに関係する治 療、あるいはその他のタイプの治療)、他に部門に属さないAML(低分化型、成熟を伴 わないもの、成熟を伴うもの、急性骨髄性単球白血病、急性単球白血病、急性赤芽球白血 20 病、急性巨核球白血病、急性好塩基球白血病、骨髄繊維症を伴う急性汎骨髄過剰増殖症)

前駆体B細胞性腫瘍(前駆体B-リンパ芽球性白血病/リンパ腫(前駆体B細胞急性リン パ芽球性白血病)、成熟(末梢)B細胞性腫瘍(B細胞慢性リンパ球性白血病/小リンパ 球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁領域B細 胞リンパ腫(+/-絨毛リンパ球)、毛状細胞白血病、形質細胞性骨髄腫(形質細胞腫) MALT型節外辺縁型B細胞リンパ腫、節性辺縁型B細胞リンパ腫(+/-細 胞) 、 濾 胞 性 リ ン パ 腫 、 マ ン ト ル 細 胞 リ ン パ 腫 、 び ま ん 性 大 型 B 細 胞 リ ン パ 腫 (縦 隔 大 細胞B細胞リンパ腫、原発性滲出リンパ腫)、Burkitt リンパ腫/Burkit t 細胞白血病) 等のB細胞性腫瘍;

、急性二形質性白血病等の急性骨髄性白血病(AML);

前駆体T細胞性腫瘍(前駆体T-リンパ芽球性白血病/リンパ腫(前駆体T細胞急性リン パ芽球性白血病)、成熟(末梢)T細胞性腫瘍(T細胞前リンパ球性白血病、T細胞顆粒 リンパ球白血病、侵攻型NK細胞白血病、成人T細胞リンパ腫・白血病(HTLV1+) 、鼻型節外性NK/T細胞リンパ腫、腸管症型T細胞リンパ腫、肝脾型ү-δT細胞リン パ腫、皮下蜂窩織炎様T細胞リンパ腫、菌状息肉腫/Sezary症候群、退形成性大型 細胞リンパ腫(T/ヌル細胞、原発性皮膚未分化型)、他に部門に属さない末梢T細胞リ ンパ腫、血管免疫芽球T細胞リンパ腫)等のT細胞およびNK細胞性腫瘍;

節 性 リンパ 球 優 勢 ホ ジ キ ン リ ンパ 腫 、 古 典 的 ホ ジ キ ン リ ンパ 腫 (結 節 硬 化 ホ ジ キ ン リ ン パ 腫 (等級1および2)、リンパ球リッチ古典的ホジキンリンパ腫、混合細胞型ホジキンリ ンパ腫、リンパ球枯渇ホジキンリンパ腫)等のホジキンリンパ腫(ホジキン病); 等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

[0051]

本発明におけるSHP1遺伝子産物定量工程は、検体試料中のSHP1蛋白質およびSH P1mRNAの少なくとも一方を定量できる方法であれば特に限定されるものではないが 、具体的には、SHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体を用いてSHP1蛋白質を定量 する方法(蛋白質定量法)か、SHP1遺伝子のmRNAの発現を検出することにより、 SHP1mRNAを定量する方法(mRNA定量法)を好適に用いることができる。

まず、上記蛋白質定量法のより具体的な手法としては、SHP1抗体を用いたウエスタン ブロッティング法または酵素抗体法(Immunochemistry)(免疫組織化学 50

10

30

法、免疫細胞化学法、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法) を挙げることができる。

[0053]

上記蛋白質定量法で用いられるSHP1抗体は、図22、図23および配列番号4に示す構造を有するSHP1蛋白質の少なくとも一部の構造を抗原決定基として認識し、SHP1蛋白質を免疫学的に確実に検出できる抗体であれば特に限定されるものではなく、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。

[0054]

上記 S H P 1 抗体は、従来公知の方法で製造してもよいし、市販の S H P 1 抗体を用いてもよい。 S H P 1 抗体の製造方法としては、例えば、モノクローナル抗体であれば、 S H 10 P 1 蛋白質で免疫したマウス pp 臓リンパ球とマウスの骨髄細胞とを融合させてなるハイブリドーマにより産生する手法が挙げられる。また、上記 S H P 1 抗体がポリクローナル抗体であれば、 S H P 1 蛋白質で免疫したウサギの免疫血清から精製する手法が挙げられる。また、市販の S H P 1 抗体としては、 # S H - P T P 1 (D - 1 1): s c 7 2 8 9 および # S H - P T P 1 (C - 1 9): s c 2 8 7 (S a n t a C r u z Biotechnology I n c . 製)、 # a n t i S H P T P (0 6 1 1 7) および # a n t i m o u s e S H P T P (0 5 2 8 1))

(Upstate Biotechnology Inc. 製)等が挙げられる。

[0055]

上記SHP1抗体を用いた酵素抗体法(免疫組織化学法、免疫細胞化学法、ELISA法 20)は、従来公知の方法(例えば、『酵素抗体法』渡辺慶一・中根一穂編集、学際企画出版(昭和61年)や、Brown R.W. et al: Modern Pathol. 199;8(5)515-20(1995)等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない

[0056]

同様に、上記SHP1抗体を用いたウエスタンプロッティング法も、従来公知の方法(例えば、『実験操作ブロッティング法』日野嘉幸他編、ソフトサイエンス社(昭和62年)や、Towbin H. et al: Proc.Natl.Acad.Sci.USA76,4350,(1979) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いること 30ができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

[0057]

上記蛋白質定量法を用いることで、抗原抗体反応を利用してSHP1蛋白質を定量することになる。そのため、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0058]

次に、上記mRNA定量法のより具体的な手法としては、配列番号3(図21参照)に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を有するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出する方法が挙げられ、より具体的には、ノーザンブロッティング法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)、リ 40アルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(real time RT-PCR)、またはRNA in situハイブリダイゼーションを挙げることができる。

[0059]

上記ノーザンブロッティング法、RT-PCR、real time RT-PCR、およびRNA in situハイブリダイゼーションの何れの方法も従来公知の方法(例えば、"Molecular cloning" a laboratory manual, Sambrook J., Russell DW., Cold Spring Harbor Lab Press. (2001) や、"Current protocols in molecular biology" edited by Ausubel FM et al., John Wiley & Sons Inc. (250

001) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

[0060]

上記ノーザンブロッティング法やRNA in situ ハイブリダイゼーションでは、原理的には、配列番号3に示すSHP1遺伝子のcDNAの全長あるいはその一部をプロープとして用いることができる。また、RT-PCRやreal time RT-PCRでも、原理的には、配列番号3に示すSHP1遺伝子のcDNAの一部と相同性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることができる。具体的には、例えば、後述する実施例3や実施例4に示すプライマーペアを用いることができる。

[0061]

それゆえ、mRNA定量法では、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を有するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出すればよい。

[0062]

上記mRNA定量法を用いることで、SHP1遺伝子の転写産物であるSHP1mRNA を定量することになるので、SHP1遺伝子のcDNAと相同性を有するポリヌクレオチドをプローブやプライマーとして利用することで、簡素なメカニズムで迅速、高特異的かつ高感度に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0063]

本発明におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程は、検体試料から得られるSHP1遺伝 20子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認できる方法であれば特に限定されるものではないが、本実施の形態では、例えば、遺伝子切断試行段階と、遺伝子増幅試行段階と、遺伝子増幅量確認段階とを含むメチル化感受性制限酵素を利用した方法(以下、説明の便宜上、制限酵素確認法と称する)を好適に用いることができる。

[0064]

本実施の形態で用いられるメチル化感受性制限酵素とは、二本鎖 DNAにおいて認識対象となる塩基配列にシトシンを含んでおり、かつ、この塩基配列中のシトシンがメチル化された場合には、該塩基配列の二本鎖 DNAを切断できない制限酵素であれば特に限定されるものではない。

[0065]

上記メチル化感受性制限酵素としては、具体的には、例えば、HpaII、EagIまたはNaeI等を挙げることができる。中でも、HpaIIをより好ましく用いることができる。HpaIIは、CCGGの塩基配列を認識して二本鎖DNA切断するエンドヌクレアーゼであるが、同じ塩基配列を認識して二本鎖DNAを切断する制限酵素として、MspIが知られている。

[0066]

上述したように、HpaIIはメチル化されたCCGGの塩基配列の二本鎖DNAを切断できないが、MspIはメチル化の有無に関わらずCCGGの塩基配列を認識して二本鎖DNAを切断することが可能である。すなわち、MspIはメチル化非感受性制限酵素である。それゆえ、HspIIとMspIとを併用することで、後述するように、検体試料 40中のSHP1遺伝子の切断を確実に確認するためのコントロールとして利用することが可能になり、本実施の形態における制限酵素確認法の信頼性をより一層向上させることができる。

[0067]

このように、本実施の形態における制限酵素確認法では、使用するメチル化感受性制限酵素と同じ塩基配列を認識するメチル化非感受性制限酵素をコントロールとして使用することが好ましい。勿論、メチル化感受性およびメチル化非感受性制限酵素の組み合わせは上記 HspII・MspIに限定されるものではないことは言うまでもない。

[0068]

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程、すなわち制限酵素確認法 50

によるSHP1遺伝子のメチル化の確認について具体的に説明する。

[0069]

まず、遺伝子切断試行段階として、造血器細胞を含む前記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識する上記メチル化感受性制限酵素で処理する。この段階では、メチル化感受性制限酵素の処理により遺伝子試料中に含まれるSHP1遺伝子の切断を試みる。すなわち、前記検体試料中に含まれる造血器細胞が正常な細胞のみであれば、SHP1遺伝子は切断されるが、造血器腫瘍細胞が含まれていれば、SHP1遺伝子はCG配列がメチル化されているため切断されない。

[0070]

前記検体試料から遺伝子試料を調製する方法は従来公知の方法を用いることができ特に限定されるものではない。また、調製された遺伝子試料は、SHP1遺伝子を含んでいればよく、制限酵素処理やPCR等を阻害しない限り他の成分が含まれていても良い。それゆえ、前記検体試料中に含まれる造血器細胞やその他の細胞から抽出される各種DNAやRNAの混合物であればよい。また、メチル化感受性制限酵素による処理についても特に限定されるものではなく、該メチル化感受性制限酵素の種類や調製された遺伝子試料の状態等に応じて、適宜条件等を設定すればよい。

[0071]

次に、遺伝子増幅試行段階として、上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子試料に対して、上記SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いて、PCRを実施する。こ 20の段階では、メチル化感受性制限酵素で処理した制限酵素処理物を、上記プライマーを用いてPCR処理することにより、SHP1遺伝子のみの増幅を試みる。正常なSHP1遺伝子のみであれば、プライマーペアに挟まれる領域が切断されているためSHP1遺伝子は増幅できないが、メチル化されているSHP1遺伝子が含まれていれば、上記プライマーペアに挟まれる領域は切断されていないためSHP1遺伝子が増幅される。

[0072]

上記遺伝子増幅試行段階で用いられる上記プライマーとしては、メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅するポリヌクレオチドであればよい。それゆえプライマーの設計条件等についても特に限定されるものではない。基本的には、本実施の形態で用いられるプライマーペアは、メチル化感受性制限酵素に認識される上記塩基配列を 30 含む領域の少なくとも外側に位置し、配列番号1または2(図1~図10および図11~図20参照)に示すSHP1遺伝子の塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであればよく、その場所やサイズ等については特に限定されるものではない。

[0073]

次に、遺伝子増幅量確認段階として、増幅された遺伝子の量を確認する。この段階では、 SHP1遺伝子が増幅されたか否かを確認する。SHP1遺伝子が増幅されれば、元の検 体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれていることになる。

[0074]

上記遺伝子増幅量確認段階で用いられるSHP1遺伝子の有無の確認方法としては特に限 4 定されるものではないが、電気泳動法を用いてマーカーと比較することにより遺伝子の増幅量を確認する手法が最も一般的で確立された手法であるため好ましく用いることができる。また、電気泳動後に得られたDNAバンドをメンプレンにブロッティングして検出してもよい。

[0075]

上記遺伝子増幅量確認段階で用いられるSHP1遺伝子の有無の確認方法としては特に限定されるものではないが、検体試料と同時にメチル化陽性およびメチル化陰性対照DNAを用いて反応を行った後電気泳動法を用いて遺伝子の増幅量を確認する手法が最も一般的で確立された手法であるため好ましく用いることができる。また、電気泳動後に得られたDNAバンドをメンブレンにブロッティングして検出してもよい。

[0076]

上記SHP1遺伝子のメチル化陽性およびメチル化陰性対照DNAは、SHP1遺伝子を用いたものであればよく、特に限定されるものではない。具体的には、メチル化感受性制限酵素またはメチル化非感受性制限酵素により処理することで得られる、増幅量を比較できる程度の濃度を有するDNA溶液を挙げることができる。

[0.077]

さらに、制限酵素確認法によるSHP1遺伝子メチル化確認工程では、コントロールとして、メチル化感受性制限酵素による処理と並行して、同一の検体試料をメチル化非感受性制限酵素で処理して、それを遺伝子増幅量確認段階で確認すると好ましい。すなわち、上記遺伝子切断試行段階では、メチル化感受性制限酵素として、同一の塩基配列を認識する 10メチル化非感受制限酵素が知られている制限酵素を用いることが非常に好ましい。これによって、制限酵素確認法によるSHP1遺伝子のメチル化の確実性を高めることができる

[0078]

本発明におけるSHP1サテライトLOH確認工程は、造血器細胞を含む検体試料において、この検体試料に含まれるSHP1遺伝子の異型接合性喪失(Lossof heterozygosity,LOHと略す)の有無を確認することができる方法であれば特に限定されるものではないが、具体的には、SHP1遺伝子を挟み込むマイクロサテライト・マーカー、または、上記SHP遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型(single nucleotide polymorphism,SNP)のような遺伝子多 20型(polymorphism)について、PCRを用いたフラグメント解析によってLOHを確認する方法を好適に用いることができる。

[0079]

上記SHP1遺伝子の両側に存在するマイクロサテライト・マーカーや、SHP1遺伝子中またはその近辺に存在する遺伝子多型については、特に限定されるものではなく、どのようなマーカーを用いてもよいが、具体的には、例えば、D12S336マーカーおよびD12S356マーカーを挙げることができる。これらマーカーの塩基配列は、インターネット・ゲノム・データベース(URL:http://gdbwww.gdb.org./)から得られる。これらマーカーのうち、D12S356マーカーはテロメア側に存在し、SHP1遺伝子から約4.4cMの距離にある。一方、D12S356マーカーは 30セントロメア側に存在し、SHP1遺伝子から約2.4cMの距離にある。

[0080]

検体試料におけるSHP1遺伝子のLOH(異型接合性喪失)の確認に際しては、SHP1サテライトLOH確認工程で用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料となっていればよい。また、LOHの具体的な方法は特に限定されるものではないが、後述する実施例6に示すように、PCR反応によって上記各マーカーの少なくとも一方の全長またはその一部を検出するマイクロサテライト解析を行えばよい。このときのPCR反応他の条件も特に限定されるものではなく、PCR用のプライマーとしては、例えば、D12S336マーカーまたはD12S356マーカーの少なくとも一部を検出できるようなプライマーであればよく、その他の条件についても適切な条件を適宜設定すればよい。

[0081]

本発明におけるSHP1サテライトLOH確認工程で用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料であれば特に限定されるものではない。また、対照として用いる検体試料も特に限定されるものではなく、血液学的完全寛解後に得られる検体を用いてもよいし、他の正常組織細胞を用いてもよい。

[0082]

このように、マイクロサテライト・マーカーやSNP等の遺伝子多型を利用してSHP1 遺伝子のLOHを確認することで、簡素なメカニズムでより確実に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0083]

なお、本実施の形態では、SHP1遺伝子のLOHを、マイクロサテライト・マーカーや遺伝子多型を利用して確認した例を挙げているが、本発明はこれに限定されるものではなく、SHP1遺伝子のLOHが確認できる方法であればどのような方法でもよいことは言うまでもない。

[0084]

次に、本実施の形態にかかる検出方法の好ましい一例について、より具体的に説明する。

[0085]

まず、SHP1遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびSHP1mRNAの少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量されたSHP1蛋白質が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんどSHP1遺伝子 10産物が発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

[0086]

次に、SHP1遺伝子メチル化確認工程で、前記制限酵素確認法により、検体試料から調製した遺伝子試料中のSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認する。以下の説明では、メチル化感受性制限酵素として前記HpaIIを用いた例を挙げる。HpaIIは、前述したようにCCGGの塩基配列を認識するが、同じ塩基配列を、メチル化非感受性制限酵素MspIも認識するため、好ましく用いられる。

[0087]

そこで、遺伝子切断試行段階では、上記検体試料から得られた遺伝子試料を、HpaII 20で処理する。同時に、同一の遺伝子試料をMspIで処理すると好ましい。これによって、CCGG塩基配列が切断されるというポジティブコントロールを得ることができる。

[0088]

次に、遺伝子増幅試行段階に移行するが、このステップでは、先に、SHP1遺伝子の塩基配列(配列番号1および2、図1~図10および図11~図20参照)から、HpaII/MspIの認識部位(CCGG)を挟んでPCR用のプライマーを設定する。具体的には、例えば、後述する実施例1や実施例2に示すプライマーペアを用いる。

[0089]

上記のようなプライマーを用いて、HpaIIで処理された遺伝子試料に対してPCRを実施し、遺伝子増幅量確認段階で、例えば電気泳動によりPCR産物の増幅量を確認する。遺伝子試料中に、メチル化されたSHP1遺伝子があれば、HpaIIは切断できないので、PCRにより目的のサイズのPCR産物が検出できる。一方、メチル化されたSHP1遺伝子が無ければ、HpaIIによりDNAが切断されPCR産物は検出できない。【0090】

このように、上記制限酵素確認法を用いれば、メチル化感受性制限酵素を用いて検体試料から得られた遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の切断を試み、さらにPCRを用いて増幅してから、得られるPCR産物の増幅量を確認することができる。それゆえ、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても迅速に高い検出感度で、しかも高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる 40

[0091]

なお、本実施の形態で説明した上記検出方法には、他の工程(プロセス)や他の段階(ステップ)が含まれていてもよいことは言うまでも無い。例えば、SHP1遺伝子メチル化確認工程において、制限酵素反応やPCR反応を円滑に進めるために、得られた遺伝子試料等を精製する精製段階が含まれていてもよい。

[0092]

本発明には、上述した造血器腫瘍細胞検出方法だけでなく、該検出方法を実施するための 検出キットが含まれる。具体的には、前記SHP1抗体、前記メチル化感受性制限酵素、 前記各プライマー、前記SHP1遺伝子陽性およびメチル化陰性対照DNA等を含む構成 50 を挙げることができる。特に、(1)上記SHP1抗体、および(2)メチル化感受性制限酵素と、PCR用プライマーと、前記SHP1遺伝子陽性およびメチル化陰性対照DNAとの組み合わせに分けた場合には、(1)および(2)の少なくとも一方が含まれていると好ましい。また、SHP1遺伝子産物定量工程とSHP1遺伝子メチル化確認工程の順番はどちらが先であっても良い。

[0093]

さらに、上記検出キットには、必要に応じて、他の各種試薬類が含まれていてもよい。例えば、ヌクレオチドモノマー、ポリメラーゼ、バッファー等のPCR反応用試薬、および、バッファー等の制限酵素反応用試薬の少なくとも一方が含まれていてもよい。

[0094]

より具体的に、各工程または段階ごとに用いられる試薬等について説明する。まず、遺伝子産物定量工程では、蛋白質定量法の場合、酵素抗体法およびウエスタンブロッティング法の何れであっても、SHP1抗体およびその検出試薬が少なくとも用いられる。また、mRNA定量法の場合、RT-PCR法やreal time RT-PCR法を用いる場合、SHP1 c DNA検出用プライマーおよびTaq DNAポリメラーゼ反応試薬が少なくとも用いられる。

[0095]

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程では、メチル化感受性制限酵素によりメチル化を確認するため、まず、遺伝子切断試行段階にて、メチル化感受性制限酵素、メチル化非感受性制限酵素、およびこれらの反応試薬が少なくとも用いられる。次に、遺伝子増幅試行段階では、プライマー、Taa DNAポリメラーゼ反応試薬、システム検討用SHP1遺伝子メチル化陽性DNAが少なくとも用いられる。次に、遺伝子増幅量確認段階では、SHP1遺伝子メチル化陽性およびメチル化陰性対照DNAを用いた反応産物を電気泳動のコントロールとして少なくとも使用することができる。

[0096]

このように、本発明にかかる検出キットでは、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ簡素に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

[0097]

〔実施の形態2〕

本発明における実施の他の形態について図25ないし図47に基づいて説明すれば以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。また、説明の便宜上、実施の形態1と重複する説明は適宜省略する。

[0098]

前記実施の形態1では、SHP1遺伝子メチル化確認工程に、メチル化感受性制限酵素を用いる制限酵素確認法を用いたが、本発明は、これに限定されるものではなく、本実施の形態では、例えば、遺伝子修飾段階とメチル化シトシン含有判定段階とを含む、重亜硫酸塩を用いてDNAを修飾する方法(以下、説明の便宜上、DNA修飾法と称する)を好適に用いることができる。

[0099]

DNAを重亜硫酸塩(Bisulfite)で処理すると、シトシンはウラシルに変換される。具体的には、図25に示すように、シトシンが重亜硫酸塩によりスルホン化(Sulphonation)され、さらに加水分解により脱アミノ化(Hydrolytic deamination)され、さらに、アルカリ存在下での脱スルホン化(Alkali desulphonation)により、ウラシルに変換される。このウラシルはPCR後、チミンに置き変わる。これに対して、メチル化されたシトシン(5'ーメチルシトシン)は重亜硫酸塩によって変換されない。そこで、本実施の形態では、この重亜硫酸塩処理後の塩基配列の違いを利用して、後述するように、SHP1遺伝子のメチル化の有無を検出する。

10

30

40

[0100]

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程、すなわちDNA修飾法によるSHP1遺伝子のメチル化の確認について具体的に説明する。

[0101]

まず、遺伝子修飾段階として、造血器細胞を含む前記検体試料から得られた遺伝子試料を重亜硫酸塩で処理する。この段階では、上述したように、メチル化されていないシトシンのみがウラシルに変換されるので、例えば、それゆえ、DNAを重亜硫酸塩処理すると、図26に示すように、メチル化された(図中円で囲んだMで示す)シトシンはシトシンのままで残存するが、メチル化されていないシトシンはウラシル(U)に変換される。

[0102]

上記遺伝子修飾段階で用いられる重亜硫酸塩としては、特に限定されるものではないが、例えば、重亜硫酸ナトリウム(Na2S2O5、メタ重亜硫酸ナトリウム、二亜硫酸ナトリウムまたはピロ亜硫酸ナトリウムともいう)を好適に用いることができる。さらに、重亜硫酸化合物とともに尿素が併用されてもよい。

[0103]

次に、メチル化シトシン含有判定段階として、重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、SHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無を判定する。重亜硫酸塩処理物中のSHP1遺伝子にシトシンが含まれているということは、処理前のSHP1遺伝子には、メチル化されたシトシンが含まれていることになる。それゆえ、シトシンが存在すれば、元の検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれていることになる。

[0104]

上記メチル化シトシン含有判定段階で実施される、SHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無を判定する方法としては特に限定されるものではないが、具体的には、1)メチル化シトシンをPCRにより検出する方法、2)メチル化シトシンを遺伝子の塩基配列の決定により検出する方法、または、3)メチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法のうち、少なくとも何れかの手法を好ましく用いることができる。

[0105]

より具体的には、まず、1) メチル化シトシンをPCRにより検出する方法としては、メチル化特異的PCR (Methylation Specific PCR) を挙げることができる。

[0106]

上記メチル化特異的 P C R 法は、メチル化された D N A に特異的でかつ C G 配列を含む塩基配列をプライマーとして設定する。メチル化されたシトシンが存在していれば P C R により増幅が可能となり、それゆえメチル化された S H P 1 遺伝子を検出することができる

[0107]

上記メチル化特異的 P C R 法は、従来公知の方法(例えば、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 , 9 8 2 1 - 9 8 2 6 , (1 9 9 6) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。なお、D N A の精製過程ではエタノール沈澱法やG l a 40 s s b e a d s 法を用いた方法等を用いることができ、また、蛍光ラベルしたプライマーを用いれば、P C R の検出を容易にすることができる。

[0108]

次に、2)遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、すなわちSHP1遺伝子のシークエンシングでは、CG配列を含まない領域にプライマーを設定しPCRを実施する。得られるPCR産物の中には、メチル化をされているもの(CG配列のままで存在)とメチル化されていないもの(TG配列に変換されている)が含まれている可能性がある。これをシークエンシングすることにより、CG配列すなわちメチル化の存在を検討する。

[0109]

10

20

30

50

上記SHP1遺伝子のシークエンシングも、従来公知の方法(例えば、Proc. Nat1. Acad. Sci. USA 89, 1827-1831 (1992)等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。なお、上記プライマーとしては、メチル化されたDNAに特異的な配列(CG配列を含む)を有するプライマーを用いることも可能である。

[0110]

この方法もPCRを用いているので、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞 10を検出することが可能となる。また、シークエンシングを利用することにより具体的な配列を決定するので、メチル化の程度をより明確化することも可能となる。

[0111]

次に、3)シトシンを含む塩基配列を識別する方法としては、Ms-SnuPE法、重亜硫酸塩SSCP法、メチルライト法、蛍光溶解曲線分析法、COBRA法等を挙げることができる。

[0112]

上記Ms-SnuPE(Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension)法は、メチル化されたDN Aに特異的なプライマーを用いてPCRを実施する方法である。ただし、プライマーに挟 20まれた領域でのメチル化の有無が判らないので、検出したいCG配列に隣接するポリヌクレオチドを作成しPCR産物とアニールさせる。放射性同位元素の存在下でDNAを合成した時に、32P-dCTPを取り込めば、そこはCG配列であるためメチル化されているシトシンが存在することになる。一方、DNAを合成した時に、32P-dTTPを取り込めば、そこはTG配列であるためメチル化はされていなかったことになる。

[0113]

上記Ms-SnuPE法は、従来公知の方法(例えば、Nucleic Acids Research 25, 2529-2531, (1997) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

[0114]

上記重亜硫酸塩SSCP(Bisulfite-SSCP)法も、メチル化されたDNAに特異的なプライマーを用いてPCRを実施する方法であるが、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らない。そこで、PCR産物を1本鎖DNAに変性後、SSCP(Single Strand Conformational Polymorphism)法を用いて電気泳動し、1本鎖DNAの移動度の違いから、SHP1遺伝子のメチル化の程度を判定する。

[0115]

[0116]

他に、メチルライト(Methyl-light)法や、蛍光溶解曲線分析(FluorescenceMelting Curve Analysis)法等も挙げられる。これら方法も、何れもメチル化されたDNAに特異的なプライマーを用いてPCRを実施する方法であるが、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らない。そこで、内側の調べたい領域について、メチル化特異的なポリヌクレオチドを作成し、このメチル化特異的ポリヌクレオチドが1本鎖にしたPCR産物とどの程度アニール(2本鎖重合)反応するかを検討することにより、上記PCR産物中のメチル化の量を判定する。

40

[0117]

上記メチルライト法は、具体的には、例えば、Nucleic Acids Research 28(8), E32, (2000) 等の文献に開示されている方法を、上記蛍光溶解曲線分析は、具体的には、例えば、Clinical Chemistry 47, 1183-1189, (2001) 等の文献に開示されている方法を好適に用いることができる。

[0118]

上述した各方法は、PCRを用いているので、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器 10腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0119]

上記 C O B R A 法 (C o m b i n e d B i s u l f i t e R e s t r i c t i o n A n a l y s i s 、あるいは、B i s u l f i t e P C R f o l l o w e d b y r e s t r i c t i o n a n a l y s i s 等とも称される) では、例えば、C G C G 配列がメチル化を受けていると、重亜硫酸処理後もC G C G 配列のままで残存するが、メチル化されていないとT G T G 配列に変換される。そこで、上記 C G C G 配列のみを切断する制限酵素等を利用することで、電気泳動ゲル上のバンドパターンを解析して、S H P 1 遺伝子のメチル化の有無を判定および定量化することができる。

[0120]

上記 C O B R A 法も、従来公知の方法(例えば、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 2 5 , 2 5 3 2 - 2 5 3 4 , (1 9 9 7) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。勿論、この方法でもP C R が用いられるので、上述したP C R による利点が得られるだけでなく、制限酵素処理と電気泳動とを用いるので、バンドパターンの解析さえ明確化しておれば、容易にS H P 1 遺伝子のメチル化を確認することができるという利点もある。

[0121]

このように、本実施の形態におけるDNA修飾法では、メチル化シトシン含有判定段階でPCRを用いているが、このPCRで用いるプライマーの設計方法について以下に説明す 30 る。

[0122]

上述したように、DNAを重亜硫酸塩処理するとシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されずに保存される。ここで、細胞内でメチル化を受ける可能性のあるシトシンは、5′配列側からCGと並ぶCG配列(5′-CG-3′)のシトシン(C)のみである。そのため、重亜硫酸塩処理により、上記CG配列以外のシトシンは全てチミン(T)に変換されてしまう。そこで、全てのCG配列がメチル化を受けたものとしてSHP1遺伝子の塩基配列を変換し、プライマーを設定する。なお、DNA中のウラシルはチミンとして認識され、PCRによりチミンに置換されることになる。

[0123]

まず、プライマーを計画するDNA鎖に関する条件を設定する。SHP1遺伝子の塩基配列において、センス鎖またはアンチセンス鎖の何れも、上記CG配列のみがメチル化を受けたとして、その他の塩基配列におけるシトシンが全てチミンに変換された配列を想定する。

[0124]

具体的には、図27~図36および配列番号5に示す塩基配列が、図1~図10および配列番号1に示すSHP1遺伝子のゲノムDNA(ワイルドタイプ)のセンス鎖に対応する、重亜硫酸塩処理後の塩基配列(以下、説明の便宜上、センス鎖変換配列とする)であり、図37~図46および配列番号6に示す塩基配列が、図11~図20および配列番号2に示すSHP1遺伝子のゲノムDNA(ワイルドタイプ)のアンチセンス鎖とするに対応50

40

する、重亜硫酸塩処理後の塩基配列(以下、説明の便宜上、アンチセンス鎖変換配列とする)である。これらセンス鎖変換配列とアンチセンス鎖変換配列とは、重亜硫酸塩処理により相補的ではなくなる。

[0125]

なお、図27~図36および配列番号5、並びに、図37~図46および配列番号6の塩基配列は、CG配列が100%メチル化されていると想定した場合に、重亜硫酸塩処理を受けたものとしての塩基配列であり、実際には細胞中で100%のメチル化が生じるとは考えられないため、本発明において検出し得る可能性としての塩基配列として例示する。

そして、(I)上記センス鎖変換配列に対して、フォワードプライマー(FWプライマー 10)およびリバースプライマー(RVプライマー)を作成するか、あるいは、(II)上記アンチセンス鎖変換配列に対して、FWプライマーおよびRVプライマーを作成する。この場合、同じ場所でもプライマー配列はそれぞれ異なる。

[0127]

[0126]

次に、プライマーを計画する領域に関する条件を設定する。(i)メチル化されたDNAのみを直接PCRで増幅するために、CG配列を含む塩基配列に対してプライマーを作成するか、(ii)メチル化されたもの、されていないものを区別なくPCRで増幅するために、CG領域を含まない配列に対してプライマーを作成する。なお、(ii)の場合は、後でシークエンシングかその他の方法を実施し、メチル化を判定する。

[0128]

したがって、DNA修飾法で用いられるプライマーの設計には、上記DNA鎖に関する条件(I)および条件(II)と、領域に関する条件(i)および条件(ii)とを掛け合わせた4通りの設計方法がある。

[0129]

ここで、(i)の場合、プライマーの場所が都合良くメチル化を受けていれば検出されるが、その場所ではなく近隣領域のみメチル化を受けているような場合には、メチル化が存在するのにも関わらず検出不可能となる。そこで、(ii)のように、メチル化の有無に関わらずPCRで増幅後、各プライマーに囲まれた領域内のメチル化、すなわちCG配列の有無を検定することで、確実にSHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、本実施の形態におけるSHP1遺伝子のメチル化の判定には、検出用のプライマ 30 一の場所のみならず、遺伝子配列の情報そのものが重要となる。

[0130]

また、CG配列がメチル化されていないと、重亜硫酸塩処理によりTG配列に変換されるが、このTG配列を含む塩基配列に対して作成されるプライマー(Unmethylated primer)は、メチル化を受けていないDNAの存在を証明するコントロールとして用いることができる。また、重亜硫酸塩処理が不十分な場合には、シトシンがウラシルに変換されていないワイルドタイプのSHP1遺伝子が混入することになる。そこで、重亜硫酸塩処理が十分完全になされたか否かのコントロールとして、ワイルドタイプの塩基配列を有するプライマー(Wild type primer)を用いることができる。

[0131]

なお、上述したメチル化シトシン含有判定段階では、PCRにより増幅された遺伝子の確認に、前記実施の形態1における遺伝子増幅量確認段階と同様の方法、例えば、電気泳動法を用いてマーカーと比較することにより遺伝子の増幅量を確認したり、さらに電気泳動後に得られたDNAバンドをメンブレンにプロッティングしたりする手法が挙げられる。 勿論、これら手法に限定されるものではなく、また、上記電気泳動法やブロッティングの方法についても従来公知の手法を好適に用いることができ、特に限定されるものではない

[0132]

換言すれば、本実施の形態におけるDNA修飾法によるSHP1遺伝子メチル化確認工程 50

30

でも、前記実施の形態1における制限酵素確認法による場合と同様、遺伝子増幅量確認段階が含まれていても良い。

[0133]

次に、本実施の形態にかかる検出方法の好ましい一例について、より具体的に説明する。

まず、SHP1遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびSHP1mRNAの少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量されたSHP1蛋白質が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんどSHP1遺伝子産物が発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

[0135]

次に、SHP1遺伝子メチル化確認工程で、前記DNA修飾法により、検体試料から調製した遺伝子試料中のSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認する。具体的には、遺伝子修飾段階にて、例えば重亜硫酸ナトリウムを用いて、上記検体試料から得られた遺伝子試料をで処理する。

[0136]

次に、遺伝子増幅試行段階に移行するが、このステップでは、前述したプライマーの設計方法に基づいて、PCR用のプライマーを設定する。

[0137]

具体的には、メチル化特異的PCRでは、図47(a)に示すように、例えば、23塩基 20 対のワイルドタイプDNA(図中上がセンス鎖で下がアンチセンス鎖)を想定し、ワイルドタイプDNAのCG配列に100%メチル化があるとする。この場合、重亜硫酸塩処理すると、図47(b)に示すように、センス鎖とアンチセンス鎖は相補的ではなくなる。そこで、図47(c)または(d)に示すように、センス鎖またはアンチセンス鎖に対してFWプライマーおよびRVプライマーを作成する。

[0138]

なお、上記メチル化特定 P C R においては、 P C R 用プライマーとして、 具体的には、 例えば、 後述する 実施例 4 や実施例 5 に示すプライマーペアを用いる。 上記のようなプライマーを用いて、 重亜硫酸ナトリウムで処理された遺伝子試料に対してメチル化特異的 P C R を実施し、 例えば電気泳動により P C R 産物の増幅量を確認する。

[0139]

このように、上記DNA修飾法を用いれば、重亜硫酸塩を用いて検体試料から得られた遺伝子試料を処理すると、塩基配列中のシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されない。そのため、遺伝子修飾段階後のSHP1遺伝子の塩基配列中にシトシンが含まれるか否かを判定するのみで、SHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、単純なメカニズムで迅速かつ高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

[0140]

次に、SHP1遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびSHP1mRNAの少なくとも一方を定量する。このプロセスで定 40量されたSHP1遺伝子産物が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんど発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる

[0141]

なお、本実施の形態で説明した上記検出方法には、前記実施の形態 1 の検出方法と同様に、他の工程(プロセス)や他の段階(ステップ)が含まれていてもよいことは言うまでも無い。

[0142]

本発明には、上述した造血器腫瘍細胞検出方法だけでなく、該検出方法を実施するための 検出キットが含まれる。具体的には、遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と前記 50 プライマー、および前記SHP1抗体を含む構成を挙げることができる。つまり、本発明にかかる検出キットでは、上記重亜硫酸塩、プライマー、およびSHP1抗体を、(1)上記SHP1抗体、(2)重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および(3)配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部を検出するPCR用のプライマーに分けた場合、(1)、(2)および(3)のうち、少なくとも何れか一つを含むことが好ましい。

[0143]

さらに、上記検出キットには、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を持つノーザンブロッティング用プローブ、または、シトシン 10を含む塩基配列を認識する制限酵素およびSHP1遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照DNAを用いた電気泳動用マーカーが含まれていてもよく、さらには、ヌクレオチドモノマー、ポリメラーゼ、バッファー等のPCR反応用試薬、および、バッファー等の制限酵素反応用試薬の少なくとも一方が含まれていてもよい。

[0144]

より具体的に、各工程または段階ごとに用いられる試薬等について説明する。まず、遺伝子産物定量工程では、前記実施の形態1で例に挙げたものと同様であるのでその説明は省略する。

[0145]

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程では、重亜硫酸塩処理によ 20 りメチル化を確認するため、まず、遺伝子修飾段階にて、各種重亜硫酸塩等の試薬が少なくとも用いられる。次に、メチル化シトシン含有判定段階では、メチル化シトシンをPCRにより検出する方法を用いる場合には、メチル化配列特異的プライマー、およびTagDNAポリメラーゼ反応試薬が少なくとも用いられる。また、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、あるいはシトシンを含む塩基配列を認識する方法では、各具体的な方法に応じて公知の試薬類を用いる。

[0146]

このように、本実施の形態にかかる検出キットでも、前記実施の形態1の検出キットと同様、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方 30 法を容易かつ簡素に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

[0147]

なお、本発明は、上述した各実施の形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施の形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施の形態についても、本発明の技術的範囲に含まれることはいうまでもない。

[0148]

【実施例】

以下、図48ないし図52に基づいて、本発明の具体的な実施例について説明する。なお 40、本発明はこれに限定されるものではない。

[0149]

〔実施例1〕

ナチュラルキラー細胞リンパ腫を含む検体試料を用い、Towbin H. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA76, 4350, (1979) に開示されている方法にしたがってウエスタンプロッティングを実施した。なお、SHP1抗体として#SH-PTP1 (D-11): sc7289 (Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)を用いた(SHP1遺伝子産物定量工程・蛋白質定量法)。

[0150]

その後、SHP1遺伝子メチル化確認工程に移行した。まず、メチル化感受性制限酵素としてHpaIIを用いて、上記検体試料から調製した遺伝子試料を37℃4時間で処理した(遺伝子切断試行段階)。

[0151]

次に、HpaIIで処理した遺伝子試料をPCRで増幅した(遺伝子増幅試行段階)。このとき用いたプラーマーペアは、配列番号 7 および図 4 8 (a) に示す 1 9 塩基のプライマーREP-S1 と、配列番号 8 および図 4 8 (b) に示す 2 0 塩基のプライマーREP-AS1 との組み合わせとした。このプライマーペアを用いた場合、配列番号 9 および図 4 8 (c) に示すように、SHP1遺伝子のセンス鎖の配列(配列番号 1 および図 1 ~図 1 0 参照)における、7 4 4 1 塩基から 7 5 6 6 塩基までの 1 2 6 塩基の塩基配列が検出 10 される。

[0152]

なお、図48(c)におけるカッコ内の「#(番号)」は、上記SHP1遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーREP-S1およびREP-AS1の対応位置、並びにHpaIIの認識切断部位の位置を示している。また、プライマーREP-AS1は、上記REP-AS1の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

[0153]

その後、アガロースゲルで電気泳動してから、得られたDNAバンドをナイロンメンブレンにブロッティングしてSHP1遺伝子の増幅を確認した(遺伝子増幅量確認工程)。 【 0 1 5 4】

次に、Towbin H. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA76, 4350, (1979) に開示されている方法にしたがってウエスタンブロッティングを実施した。なお、SHP1抗体として#SH-PTP1 (D-11):sc7289 (Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)を用いた(SHP1遺伝子産物定量工程・蛋白質定量法)。

[0155]

上記SHP1遺伝子メチル化確認工程とSHP1遺伝子産物定量工程との結果から検体試料中の造血器腫瘍細胞を検出した。

[0156]

〔実施例2〕

遺伝子増幅試行段階で、プライマーペアとして、配列番号10および図49(a)に示す 21塩基のプライマーREP-S2と、配列番号11および図49(b)に示す21塩基 のプライマーREP-AS2との組み合わせを用いた以外は、前記実施例1と同様にして 検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検出した。

[0157]

上記プライマーペアを用いた場合、配列番号 1 2 および図 4 9 (c) に示すように、SHP 1 遺伝子のセンス鎖の配列(配列番号 1 および図 1 \sim 図 1 0 参照)における、 6 8 5 8 塩基から 7 0 8 4 塩基までの 2 2 7 塩基の塩基配列を検出することができる。

[0158]

なお、図49(c)におけるカッコ内の「#(番号)」も、上記SHP1遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーREP-S2およびREP-AS2の対応位置、並びにHpaIIの認識切断部位の位置を示している。また、プライマーREP-AS2は、上記REP-AS2の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

[0159]

〔 実 施 例 3 〕

RT-PCRによるmRNA定量法を用いてSHP1遺伝子産物定量工程を実施した以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。

[0160]

50

20

30

すなわち、前記検体試料から全細胞内のRNAを調製してから逆転写酵素により逆転写した。その後、SHP1特異的プライマーペアを用いてPCRにより増幅した。上記SHP1特異的プライマーペアとしては、配列番号13および図50(a)に示す23塩基のプライマーSHP-PR1と、配列番号14および図50(b)に示す25塩基のプライマーSHP-PR1との組み合わせを用いた。

[0161]

〔実施例4〕

real time RT-PCRによるmRNA定量法を用いてSHP1遺伝子産物定量工程を実施した以外は、前記実施例3(すなわち前記実施例1)と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。上記SHP1特異的プライマーペアとしては、配 10列番号15および図51(a)に示す20塩基のプライマーSHP-LF1と、配列番号16および図51(b)に示す20塩基のプライマーSHP-LR1を用いた。

[0162]

〔 実 施 例 5 〕

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93, 9821-9826, (1996)に開示されている方法にしたがってメチル化特異的PCRを用いてSHP1遺伝子メチル化確認工程を実施した以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。なお、重亜硫酸塩としては、重亜硫酸ナトリウムを用いた。

[0163]

また、上記メチル化特異的PCRにおけるプライマーペアとしては、配列番号17および図52(a)に示す24塩基のプライマーMF2と、配列番号18および図52(b)に示す21塩基のプライマーMR2との組み合わせを用いることができる。このプライマーペアを用いた場合、配列番号19および図52(c)に示すように、SHP1遺伝子のセンス鎖の配列(配列番号1および図1~図10参照)における、7037塩基から7195塩基までの159塩基の塩基配列を検出することができる。

[0164]

なお、図52(c)におけるカッコ内の「#(番号)」は、上記SHP1遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーMF2およびMR2の対応位置を示している。ただし、上記各プライマーはメチル化されているDNAのみを検出できる 30ように設計されているので、その塩基配列は、上記下線部の塩基配列とは少し異なっている。また、プライマーMR2は、上記MR2の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

[0165]

〔実施例6〕

検体試料として、診断用の骨髄(BM)検体と、ALL(急性リンパ芽球性白血病)患者の末梢血(PB)検体とを用いた。ALL患者から得られたBM検体は少なくとも70%の比で芽細胞を含んでいた。また、これら検体試料に対する対照試料は、化学療法によって達成された血液学的完全寛解の後に得られた。

[0166]

上記検体試料を用いてマイクロサテライト解析を行った。このときのPCR反応では、5 '側のプライマーを、5 'ーi o d o a c a t a m i d e f l u o r e s c e i n でラベルし、反応系は、1 0 p m o l のそれぞれのプライマー、4 0 n g のゲノムDNA、1 × P C R バッファー、2 0 0 μ M のそれぞれの d N T P と、0 . 5 u n i t の T a q D N A p o l y m e r a s e を含む 2 0 μ l の系とした。得られた P C R 産物は、A B I P r i s m 3 1 0 0 D N A s e q u e n c e r (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) にかけ、G e n e s c a n A n a l y s

is software ver 3.7 (Applied Biosystems) で

解析を行った。 【0167】

50

40

その結果、図53(a)・(b)に示すように、D12S336マーカーおよびD12S356マーカーによってSHP1遺伝子のLOHの有無を確認できることがわかった。本実施例の結果では、これらマーカーのうちテロメア側のD12S356マーカーでは、有意な結果が得られた19症例中15例(79%)にLOHが認められた。また、セントロメア側のD12S36でーカーでは、16症例中6例(38%)にLOHが認められた

[0168]

上記何れの実施例の結果も、検体試料から十分に造血器腫瘍細胞を検出することができた。それゆえ、本発明は、複数の診断手法を併用しなくても造血器腫瘍細胞を容易かつ迅速に検出することができることがわかった。

[0169]

【発明の効果】

以上のように、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法は、造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なSHP1蛋白質およびそのmRNAの少なくとも一方を定量するSHP1遺伝子産物定量工程と、上記検体試料から得られる、上記SHP1蛋白質をコードするSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認するSHP1遺伝子メチル化確認工程と、上記検体試料に含まれるSHP1遺伝子の異型接合性喪失(LOH)の有無を確認するSHP1遺伝子LOH確認工程とを含む方法である。

[0170]

[0171]

本発明の方法または構成によれば、SHP1遺伝子の発現を、遺伝子DNAの修飾とmRNAと蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカーを用いて判定できることになる。すなわち、SHP1遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を4段階で確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。よって、本発明を用いることで、造血器細胞を含む微量の検体試料から造血器腫瘍細胞を容易かつ迅速に検出することができる。

[0172]

それゆえ、本発明における悪性リンパ腫・白血病の高感度検出法を用いると、一般集団検診による造血器腫瘍の早期発見、診断および治療後のモニタリングや再発の早期発見が可能になり、これら疾患を発症した家族等血縁者における発症危険度の予測等に本発明を利用することも可能となる。その結果、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となるという効果を奏する。

[0173]

【配列表】

(110) Japan Science and Technology Corporation

<120> Hematopoietic malignant cell-d lignant cell-detection kit

<130> Y2002-P331

```
(160) 19
```

 $\langle 170 \rangle$ PatentIn Ver. 2.1

<210>1

 $\langle 211 \rangle 18404$

 $\langle 212 \rangle$ DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> genomic DNA

<400> 1

tagaccaaat gtc ccatctagtt gtgcccagtg aaacagctgc ccactgcatgcgt cctgtttggc tcttaggcac gct cctccaggtg actaccaccc tcg gcaggtgtcc ttaagtttgc actccctctt caggcaagct gaa tcctgagatc gccagcctgt ctggtggcag cgt gccaccccat gggcctgctg gaaaggcctt gat ttgtgccact gccaggggag tggtgtcagt ctcttgcgga cctgacttagcct ccatccccct gaa tccctctgcc tttccaggcc cccagggcc taaccctacc tga cctaaccctg tgg gagtgggtcc ctcagcgccc tgagaggctg ggaactgggc tgttagggat ttt ccttctctga tgctcttcct ccccattggt cag gagaggtttc tgtcagcttg agc cccgccgctc tacccaatac cctggaccag cag ctctcccggg ggaaggcggc tgtgggcggt ctcgctgcaggga agctggccgc

30

20

10

tcctggagac tattagtcca	gggtttgtcc ctgcagtgcc	attggcctgg caggcaggat	1020
cgaggaggaa	gtggctgatt	actgagcggt	tct
cagctgtgcc	gctggctcag	ccccgccccc	tgc
tacagagaga	tgctgtcccg	tgggtaagtc	ссg
tagttttgga	gggagggagg	gctttgttga	tgc
cgatctgccg	ctgccctgcg	cctgtttccg	gtc
gtgaggaccc	ccggctcact	catgctcctc	t g c 10
agtgtgtatc	tgttctctcc	attgcatttc	tac
ctcctgctta	ggacctgtcc	ccctgggtag	ctc
gccacccgcg	aaggccctcc	cacgtccagc	саа
ttggtcccat	cttctttgtt	tcctttcact	tcc
gtacgtgttg	agcatctatt	atgcaccagg	tgc
gaacaagaca	gacatggtct	ctgctctcac	gga
ccgaacaaat	aacccaataa	attggatcat	tgc 20
tagacagcct	tggccgggtg	tagtggttca	cac
aggcgagagg	attgcttgag	cccaggagtt	tga
ctgtctctac	aaaaaataag	aaattagctg	ggt
ctatggagag	gctaaggtga	gaggcttgct	tga
gatgattgca	ccactgcaca	ccagcctggg	cga
aaaaaaaaa	gaaaatgaac	cagcttcata	tgc
attactagct	ggagggatca	gggaggcctt	C C C 30
ggatgaggag	gaagaggagc	tggccatgtg	acg
gcagaggaga	tggtgagcac	aaagccctaa	tgt
cccgtggcag	aggaccctag	tggagcggag	gca
agctaggatg	ttgaaagtga	aaacctgacg	aga
cactttggga	ggccgaaggg	ggaagattgc	ttg
caacatagag	agaccccatc	tctattaaaa	ааа
tggtagtcct	agcagtttgg	gaggctgagg	tgg
gaccaccctg	ggcaacatag	ggagagacct	cat 40

tactaataaa tagctggatg	tagtggcatg cacctgtggt	ctcagttact tggaaggctg	2760
aggcaggagg	atcacctgag	ccaaggaggt	cga
gcacttcagc	ctgggtgata	aagcaagatt	ctg
gaaggaaaga	aggaagggaa	ggaagaaaga	aaa
cgagaaagaa	gaaagaaaag	gaaggaagga	aag
aagtgacacc	cagtcgaaag	aagaaaggaa	aga
gaaaaaagaa	aaagtgacaa	ccggctgggc	atg 10
ttgggaggcc	gaggcaggtg	gatcacgagg	tca
ggtgaaaccc	tgtctcaact	aaagatacaa	aaa
acctgtgagt	cccagctact	agggaggctg	agg
ggaggttgca	gtgagccgag	attgcgtcac	tgc
ctccatctca	a a a a a a a a a a	aaaaagaaaa	gaa
ggcgagtttg	tgggtgggtg	gctccctagc	c c t
ctgcccctgc	cccagtgcac	atcttgtcac	tgt 20
gtcttctggt	ccctgatccc	gtctgtggtc	att
cccctggtgc	agatttcatc	cttggtttct	cag
gggtccccac	ctctcagaac	aactttgctc	cag
tgcccatgtg	gactctgtgc	gtgccacctc	t t t
gcacttcttc	ctccaccttc	catcatgggc	tgt
cgctgtctgc	tgcagtatgg	ttgttggggg	aaa
cgtgttttac	ccaccttcct	actcactagc	ttg 30
tgagtcttag	tttctgtttc	taaaattggg	tga
gaggattaat	agtataatgt	aaaagctggc	agc
tcacatcagt	atttgggaaa	tattgttaag	ctc
agagcagttc	cagaactttc	tacagattat	t t t
tcttcttgta	tcaccattga	tcttgatctg	tat
ggagtttcac	tctgttgccc	aggctggagt	gcg
tccacctcct	gagaagctgg	gattacaggc	tag 40
agctggtctc	gaactcctga	cctcaagtga	tcc

gattacaggt gtaagtcact	gcgcccagct gtattttat	tttttgagac agggtctcac 450	30
tctgtcaccc	aggccggatt	acagtggcac a	ac
caggctcaag	cgatcctccc	atctcagtct c	c c
accacacctg	gctaaatttt	gtatttttt t	ag
ctgctctcaa	acttggtgtc	aagtaatcca c	ca
acaggcgtga	gccactgcgc	ctggccttga t	c t
aatattttt	tcttctgaat	tatcaggcat t	t a 10
ttgtttccgc	ccataagaaa	atggggaaaa t	ga
ctaaatgaga	tcgtgtatgt	gaaagtgatc t	g c
aggtagtttt	ttattttcct	gccaaaggat a	gс
gtctcttggc	ttgacaccct	tcagaggaat t	сс
gcctagttag	tttcttctgg	gtgccgagtt a	a t
tggaaggagt	gtcttggggc	cagggtgcag t	gg
acttcgtgtg	tggtcagatt	tatgttccat g	c g 20
gtgtaggtgg	acatggatga	tgaggtgtgt g	tg
cgtatgacaa	gcaggctgtg	tgtgtaggac c	ag
gctatggact	gacgagcttg	tttgttgaac a	c t
tctgaacact	ccgagatgag	cgagagcgcc a	gc
catgtgctct	tcttgctcct	tggcgttggg c	g t
ggggtggtgt	ccaagctgaa	ggggtagtca a	ag
agattcccca	gggcaccagt	gagagaagaa a	a c 30
aagaaaagtg	gaaaagcctt	ttttggggga a	a a
ataatgtagt	tatcatggga	aaattagact t	g t
ctgaagcaga	acatgcataa	tgttcataaa t	a t
tttttttt	gaaatagagt	cttactgtgt t	gc
ggctcgctgc	aacctcggct	tcctgggttc a	ag
agctgggatt	acaggcgccc	accaccatge c	c a
agggggtttc	accatgttgg	ccaggatggt c	t c
cttggcctcc	caaagtgctg	ggattacagg c	g t

tttatacaca cccatgcaaa	cagcatccag atagagacaa	agageettee etgtaceeta	6240
aaagtttccc	agaaattgtt	cccagttagc	ata
catcatataa	cattcaaaaa	ggtatgtaga	gaa
cagccaccca	gtttccctcc	ctaggggaag	сса
gttgagctgc	ttttcctcgt	tttggtttgg	cgg
gtaggcagca	tcatatacct	tagtgtttag	ggc
tcagccatgg	tgaggacctt	gtcccccagc	c c c
ctggggcagg	gcagaggcct	agggacaaga	att
tcagggtcat	gttgtccatc	cctctgccac	agt
agaggaggc	acccttctct	cttgcaagca	ttg
tcccatggca	gcccctttgg	acaaggaggc	t c t
gctggtgtat	aggagttcaa	agcactggct	ttg
ggcactgcag	ctgactcact	gatggactca	ggc
ttccttgtct	gtaaaatgat	aaagatagcc	c c t
atcagacaag	gcatgtgaac	gccattatag	cac
cgatgacagt	tgtcaccgcc	atcattgtta	t t a
gcagctggtg	gaggaggag	agatgccgtg	gga
tatctgggcc	tggagtgtgc	aaggcacaca	t g t
gtgcaatgcc	atgctcctga	gcctttgatt	gca
acccccagtg	ccaccctgct	ctgcttctct	tcc
aagtgagttc	ccccaagggg	tcggccgcgc	c t c 30
caggccagtg	gagtggcagc	cccagaactg	gga
actgggagct	gcatctgagg	cttagtccct	gag
ctcctcattc	cctgcgcccc	cttcctctcc	gga
tgccacccac	ggtagacagg	aggcaagggt	gcc
ccctgcctgg	gccgcccagg	tggtttcacc	gag
tgctcaaggg	ccgaggtgtc	cacggtagct	tcc
gtgacttctc	gctctccgtc	aggtaggtgg	g c c 40
tctcttgtgc	catccaggcc	ctgaaccact	cat

ccccgtctgt tcccttgccc	ccaacccca cactccccat	ccctgtctgt gcccacccat	7980
gcccatgtgt	gcccccaccc	aggacctcag	ссg
caccgactgg	cctcaccgcc	tggtgccctg	cag
gatccagaac	tcaggggatt	tctatgacct	gta
agagctggtg	gagtactaca	ctcagcagca	g.g g
catccacctc	aagtacccgc	tgaactgctc	cga
cacccccgcc	attcccaagc	agggatgagc	cgg 10
gggagactgg	cagccggcgc	tgcctaccct	сса
gctctcaatg	tccctcctcc	ctgctgtcct	ggg
accctttcca	cctaaccccg	aggaagccac	aga
ctggccgctg	caacccaggt	cccactggag	aca
tcgtgcaggc	cagctctgtt	gttagaaagc	tct
ctccgtctgc	ccctcacccc	agcacatgtt	agg
gatggggatg	aatgcttgcc	aagacacttg	atg 20
ggtctgtcct	gtggggtcaa	ataggtctcc	ggc
gtgaagtgtt	cacctgtgta	aagtgtctca	cgc
gcatttcctt	cctgtggcct	ccccgactcc	tcc
ggctgggggc	tctgaatgct	cctcatgaca	сса
tgccagatcc	ccttagagta	aagggcagcg	gaa
cctgggccaa	gccgacttgc	ccttgccgtg	gat
atgatcggga	accttgctcc	tgccagcttg	cag 30
gcatcaatat	ttttggtcaa	ggcactgatt	gaa
agccctgtgg	cccacctggg	aggcctcctt	tcc
tctctctgtg	agcctcacat	ggctggctcc	gtg
ccgcaacact	cagggggctt	ttggcaccga	gac
ccttgcctcc	agccaggaga	ggaggacggg	ctg
gcagggcccc	aggaggcccc	tgcagaggag	gct
agagagagaa	ggaaggagg	gcagtgccgg	ggc
tggaggccct	tttgggtgac	ccgtcccagg	agc

```
gtgagagget etticteeca ggttetgetg tgteetetge ettgtetgtg egeeteetee 9720
tctgcgagaa
             tttgcatctg
                          tccctcggtg
                                       gct
ttgcatggag
             acttcctcat
                          cctggggcct
                                       gag
cctggggtcc
             tagcctgtcc
                          ccaggcggtg
                                       ggc
tctgggggtc
             tctcggctgg
                          agtcacctcc
                                       ggg
ggtcctcccc
             tccttccccc
                          catccctgcg
                                       gtt
cctgggctga
             ggaaacctca
                          caacctcact
                                       tct
                                                10
ttttttccat
             cacgtggttt
                          cctgtggggc
                                       tgg
ggaaaggggt
             gtgcttcggg
                          gaaagggctt
                                       agt
aaatccgttt
             gaaccctggg
                          ctccccttca
                                       gtg
ctacaccact
             ctttccccag
                          tggggttgtc
                                       ttc
tccgccttcc
             ttgtgacttg
                          agtctgtgtg
                                       tcc
ctcggtctgc
             gtttctcttt
                          gcctctggtc
                                       tct
agattcatcc
             ttagcttctc
                          tcctccaaat
                                       att
                                                20
cagaggtggg
             ctctgggttc
                          gaagcccggt
                                       tag
ctgggaggtc
             gaggctgcag
                          agagctgtaa
                                       ccg
gagctctgga
             agcttgccct
                          agagtcagtc
                                       aag
gcgtcagttt
             cctcatctat
                          aaaatggggg
                                       taa
tgagagacct
             aaatgaggtg
                          gtggatttgg
                                       aag
                          ctctctgtga
aggtgcttga
             tttccggccc
                                       atg
ctgggtctta
             ccttccctga
                          cgctgccttc
                                       tct
                                                30
gggcaggcag
             agacgctgct
                          gcaggccaag
                                       ggc
agcctcagcc
             agcctggaga
                          cttcgtgctt
                                       tct
ccaggctccc
             cgctcagggt
                          cacccacatc
                                       aag
             cctctgctga
ggcggggag
                          ggctcctgtc
                                       tgt
ctgcctgggc
             ttgaattcaa
                          ggctggggac
                                       cca
gcctaatttg
             gctcccccca
                          gggtggacgc
                                       tac
agcctcacgg
             acctggtgga
                          gcatttcaag
                                       aag
                                                40
tttgtctacc
             tgcggcaggt
                          caggggtggg
                                       c c c
```

agaaccgcta caagaacatt ctcccctgtg agc accgcccctg ccccagctgc ctcccctcat ctc gggccatctc cccaacaccc ccaacagagcc tcc ccagaagtgc ctccccacca ccaacaggca ggt actccctcac tccctcata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtcaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgcc ccg gagcagtcag atgccagga aggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgccc ccg gagcagtcag atgccagga agacagccat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc aggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctccacc ttaccctgca ggctccccct aca gatctcccacc ttaccctgca ggctccccct aca gatctccccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctccccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctccccc ttaccctgca ggctccccct aca	tcccccagat gtgagc	ttct gggatctctg agttgctgac	ttctcgctct tccccacccc	11460
atggtggga ccggcagggc tggggcagct gag cggacacctt cccctcttg cccacctctg ctc atggatgcc tctttgggag ctgatgctca ttt agcaggaggt gaagaacttg caccagcgtc tgg agaaccgcta caagaacatt ctcccctgtg agc accgcccttg ccccagctgc ctcccctat ctc gggccatctc cccacacccc ccacagaggc tcc ccagaagtgc ctcccaca cagaaggca ggt actccctcac tccccaca cagaaggagt actccctcac tccccaca cagaaggaagt cctatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctc cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac actacatca aggtcagcag tgtgggacac gtg ccttgttggt ggggggaccc tagaaccaa ggc tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cgtggcagc tctccacag ggttgtctgg aggacatcag agacagcag tgagtcaga acc agacctacat cgccaggcag tgtgtcagg cgtggcaga gaacagccgt gtcatcgca tga tagggcgcc ccccttcccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccaggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccaa agtctcgact acactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tctttctgagc tccaggaccca ggt ctgcccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgccc tttaccctgca ggctcccct aca agtctccacc tttaccctgca ggctcccct aca gatctccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	agccgtact	ta tgccacgagg	gtgaatgcgg	ctg
cggacacctt cccctcttg cccacctctg ctc atggatgcc tctttgggag ctgatgctca ttt agcaggaggt gaagaacttg caccagcgtc tgg agaaccgcta caagaacatt ctcccctgtg agc accgccctg ccccagctgc ctcccctat ctc gggccatctc cccacaccc ccacagagcc tcc ccagaagtgc ctccccacca ccagcagca ggt actccctcac tccctcata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgagacagt aac actacatca aggtcagcag tgtgggcac gtc tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tggttcaggg cct agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcaga gaacagccgt gtcatcgca acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcaga gaacagccgt gtcatcgca tga tagggcgcc ccccttccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccagga agacagcagt ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc caggacccc ccg agacagtcac tcttctgagc caggacccc ctg agacagtcac tcttctgagc caggacccc ccg agacagtcac tcttctgagc caggacccc ccg agacagtcac tcttctgagc caggaccccc ctg agtctgcccc tttaccctgca ggctccccc ctg agtctgccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	acaagaago	ca ggagtccgag	gatacagcca	agg
atgatgccc tctttgggag ctgatgctca ttt agcaggaggt gaagaacttg caccagcgtc tgg agaaccgcta caagaacatt ctcccctgtg agc accgcccctg ccccagctgc ctcccctat ctc gggccatctc cccaacaccc ccaagaggcc tcc ccagaagtgc ctccccacca ccagcaggca ggt actccctcac tccctcata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acggacagt aac actacatca aggtcagcag tgtgggcac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggtcaagg acg gggtgcgtc tctccacagc tggtcaagg acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagtcag acagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccaggacaa agtctcgcc ccg aactgagga gaacagccgt gtcatcgca tga tagggcgccc tcttctgagc cagaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc caggcccct ctg agtctgcccacc tgtctgcatc caggcccct ctg agtctgcccacc tgtctgcatc caggcccct ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccct aca gatctccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	atggtgggg	ga ccggcagggc	tggggcagct	gag
agcaggaggt gaagaacttg caccagcgtc tgg agaaccgcta caagaacatt ctcccctgtg agc accgcccctg ccccagctgc ctcccctat ctc gggccatctc cccaacaccc ccaacagagcc tcc ccagaagtgc ctccccaca ccagcaggca ggt actccctcac tccctcata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acggacagt aac actacatca aggtcagcag tgtgggcacac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggtcaagg acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcgtc tctccacagct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagtc tctccacgct tgcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccag agcatcgtca tga tagggcgccc cccttcccc gcatccgcc ccg agacagtcag atgccaggacaacacacacacacacacacacacacacaca	cggacacct	tt cccctccttg	cccacctctg	ctc
agaaccgcta caagaacatt ctcccctgtg agc accgccctg ccccagctgc ctcccctcat ctc gggccatctc cccaacccc ccaacagagcc tcc ccagaagtgc ctcccaaca ccagcaggca ggt actccctcac tccccaaca cagaatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tgttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacacct tgcgtcaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagagagaccct tacaccct gtg tagggcgccc ccccttcccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccaggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tctttctgagc tccagacca ggt ctgccccacc tgtctgcatc aggcccct ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctctaca ggcccccc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccc aca atccctgggc tcttctctacac ggcccccc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctcccatcc gtgacacaa ctgggtcaag ttc	atggatgco	cc tctttgggag	ctgatgctca	t t t
accgccctg ccccagctgc ctcccctcat ctc gggccatctc cccacacccc ccacagagcc tcc ccagaagtgc ctccccacca ccagcaggca ggt actccctcac tccctccata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt gggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggtgggcac gtg gggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagag agacagccag ggttgtctgg agg cgtggcagag agacagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccaggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc caggccaccac ggt ctgcccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctga ggctcccct ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccct aca gatctcccatcc gtgacacaa ctgggtcaag ttc	agcaggagg	gt gaagaacttg	caccagcgtc	tgg 10
gggccatctc cccacaccc ccacaagagcc tcc ccagaagtgc ctccccacca ccaagaggca ggt actccctcac tccctccata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcac tagtcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtcagga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcaga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgcc ccccttcccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccaggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc aggcccct ctg agtctgccc tctctcgagc cagacacca agt ctgccccacc tgtctgcatc aggcccctc ctg agtctgccc ttaccctgca ggctcccct aca gatctcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	agaaccgct	ta caagaacatt	ctccctgtg	agc
ccagaagtgc ctccccacca ccagcaggca ggt actccctcac tccctcata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac actacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg ctgcttgtt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggt agggtggcag tggttcaggg cct gggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagcag ggttgtctgg agg cgtgcgtc tctccacgct gtcatcgtca tga tagggcagt gaccatcgcc ccg agacctacat cgccagccat gtcatcgtca tga tagggcagtcag atgccag agacctacat cgccagcag ggttgtctgg agg cgtggcagtcagtagtcag atgccaggcagtcatcgcc ccg agacagtcag atgccaggc agaaagggat ctcaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgcccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgccc ttaccctgca ggctcccct aca gatctcccatc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	accgcccct	tg ccccagctgc	ctccctcat	ctc
actccctcac tccctccata cagatgatcc ccc gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcaga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccaga agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccct ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccct ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	gggccatct	tc cccacacccc	ccacagagcc	tcc
gcctcatggc ttctgagacc agaatggcct gtt gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcaga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgcc ccg gagcagtcag atgccaggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctccccc gtgacacaa ctgggtcaag ttc	ccagaagt	gc ctccccacca	ccagcaggca	ggt
gtgagtccct ggctaaccca gaccatctcg cct agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgcccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc tctcccc gcccccc ctg agtctgcccc tcttctgag ctcaggccact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	actccctca	ac tccctccata	cagatgatcc	ссс
agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgcccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccct ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccctt aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	gcctcatg	gc ttctgagacc	agaatggcct	gtt
agccgagtga tcctgcaggg acgggacagt aac aactacatca aggtcagcag tgtgggccac gtg ctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcaga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgcccacc tgtctcaca agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	gtgagtcc	ct ggctaaccca	gaccatctcg	cct
cctgtctggt ggggggaccc tagatccaga gac tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgcccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatctccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	agccgagt	ga tcctgcaggg	acgggacagt	
tgcatgggtg agggtggcag tggttcaggg cct ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	aactacat	ca aggtcagcag	tgtgggccac	gtg
ggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgcccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccctt aca gatctccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	cctgtctg	gt ggggggaccc	tagatccaga	gac
agacctacat cgccagccag ggttgtctgg agg cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctcccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	tgcatggg	tg agggtggcag	tggttcaggg	cct
cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	ggggtgcg	tc tctccacgct	tgcgtccaga	асс
tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	agacctaca	at cgccagccag	ggttgtctgg	agg
tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg gagcagtcag atgccagggc agaaagggat ctc aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	cgtggcag	ga gaacagccgt	gtcatcgtca	tga 30
aaactgaggg ctagtgacaa agtctcgact aca atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	tagggcgc	cc ccccttcccc	gcatccgccc	
atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	gagcagtc	ag atgccagggc	agaaagggat	ctc
ctgccccacc tgtctgcatc caggcccctc ctg agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	aaactgag	gg ctagtgacaa	agtctcgact	aca
agtctgcccc ttaccctgca ggctccccct aca gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	atccctgg	gc tcttctgagc	tccagaccca	ggt
gatcccatcc gtgacacaaa ctgggtcaag ttc	ctgcccca	cc tgtctgcatc	caggcccctc	ctg
4	agtctgcc	cc ttaccctgca	ggctccccct	aca
	gatcccat	cc gtgacacaaa	ctgggtcaag	t t c
	tcctggtc	ac ctttgggata	aagtcgcact	cta

tccctctgac ccgcacgct	t ctcttgaagg ctcaccgccc	ccagcagccc cagctctttc	13200
aggttcccag	cctttctttg	cacaagctca	ttt
tatctctgcc	tggcagatgc	ctcgtttttg	aag
gaatccaggt	cttgtttcct	ccaggaccta	gag
tcctcagcgc	ggtgtctccc	ccggtcacct	gtc
acagactggg	tgttatttgt	gtctgtgaag	ctg
gcctgccctg	gcaacgtttg	ttgaatgaca	aac 10
gcctcaccac	ctgttggtgg	ttgatctgag	acg
agcccatccg	tccatccaac	aaatgtttgg	gcc
ggacctggga	tgggccacag	tgccctgctc	tgt
ccagaacaaa	tgcgtcccat	actggcccga	ggt
ctctgtgacc	aactgcgggg	agcatgacac	aac
ctccccgctg	gacaatgtga	gtggccccca	cgc
ggacttgttc	tcctctctgg	tcgggtaggg	tga
ggggcactga	ccctatgtcc	tcggcttagg	gag
agtacctgag	ctggcccgac	catggggtcc	сса
tggaccagat	caaccagcgg	caggaaagtc	tgc
gcaggtgagg	atgataatcc	tgatggtagt	agt
tgccatgagc	tgttataagc	aatataaacg	tta
cccccggctt	ctcctgggtc	ccctcatggc	tcc
ccagccccac	tttggccctc	tgcctgtggg	tat
catctcgccc	aaccctgcca	aatacagagg	agg
ccaagctagt	cagggcaagg	ccgggcaggc	асс
cgctttctct	cgaggtccca	ttctgttggt	ttc
tgctccccat	tcctcctctt	tttccatcgg	tag
ctgccctctc	tcccagcttc	cccaggcagt	gcc
gatgggtgat	gcttctttgg	ggctgcacat	aac ·
tgatcaggag	acctctggta	aggtgcagag	gtg
acaggtgagc	ccactgagct	ggcctggcct	ggg 40

cctccgctta ccagctgtgt	ggtcttggac aaattactta	actiticiaa cccicagcii	14940
cctcatctgt	aaaatcagga	tctcagggtt	gtc
gtggctggaa	ttccgtcagc	cctcaaaaac	tgg
tcaggcagag	aataggggaa	tgggaacctg	cct
tggaccccag	gcctgcgacg	gcctctggct	tcc
tgggacaggg	caagtcggct	gaatctagag	gtg
ctctgtcctg	tgctctctca	gggacaggcc	cat 10
gccacacaca	cattcacaca	cttcttgaaa	gcc
aaggaagtgg	gtgtgggggg	ttatttttga	caa
tcagggcatc	agcttgctgg	gctcagctga	ggg
ttgcccaggg	ctgggaaagg	agagaaactt	cct
ccctgtgccc	ccgcaccctg	ctgtctcagg	gct
ggaaaaggga	agtgaagcca	tgctgagaga	cgc
gagggctcag	ggtacctggg	agccggcagg	a c a 20
tccggggtgg	gggcagccac	tcactaggag	tga
aaggatggtg	gcagctgggg	agccagcgtc	agc
catgcagagc	tgggcaaacc	tccatcatca	ctt
ccatcactgg	aggctcaggc	tgctcctgtg	gtg
ccccccttcc	cggggagggc	ttgactggcc	tct
cggcatcggc	cgcacaggca	ccatcattgt	cat
caagggtgag	gggcacctgg	gggtttgggg	gtg 30
ctatgcctgg	acctgaggtt	tgactgcccc	сса
ccagaagacc	atccagatgg	tgcgggcgca	gcg
gtacaagttc	atctacgtgg	ccatcgccca	gtt
ggtcctgcag	gtgcgtgcag	agcagggcct	ggg
gtgccacctg	gccctgctgg	gaccaccacc	ttc
aagggccagg	agtcggagta	cgggaacatc	acc
gccaaggcct	cccgcacctc	gtccaagtga	gtg 40
cccctttgtc	ctgcccagcc	cgatcctcac	ttt

gggacctggc ttcaagttca	ggcttggttc tcaccccttc	tgttcataag catttcctga	16680
gtgcccacac	gtgtgggcct	ctgctaggta	сса
ctctgtcctc	taggagcttg	gagtctagtg	cag
ggggtggcca	gagggactg	ccagtgccgg	gtc
aactgcctgt	acttgccccc	ctgcacccgg	ctg
cctgcacact	aagaacaaga	gggaggagaa	agt
gaagagcaag	ggttccctca	agaggaagtg	agc 10
agctcttctg	cctgggtgtc	ctccctgccc	tgc
ctgggtggat	ggggtggccg	cagcctcatt	ctg
gttccacctc	caggttccag	ctaccctctc	act.
agccctgacc	ctgtggaagc	atttcgcgat	gga
ccccattctt	ttgtaattta	aatggctgca	tcc
agcccagcca	ggccccaggc	agggccaacc	ctt
cactgtgtgt	cgcctctgag	ccctttgctt	gcc 20
caggatgggt	aactgtgtgt	gcctccgtgc	gtg
agacggacgt	gggtcgggac	tccgcctcgc	acg.
ccagtctcct	tctttaaaat	ggagggcgat	cat
atgacggctg	acgataagac	gggcacagtg	act
actaaaagac	tacacacgtt	agttcagtct	agg
gcggaaactg	agggacagaa	aaactaagta	act
atggaacagt	gaggctggga	ttcgaaccca	ggc 30
accctggagt	tgcagctggg	gccaccctca	ggg
gagttccaga	tctgaactaa	gaagagtagt	t a a
	tcccctctgg	cgggaacagg	gac
	cctcatccag		ccc
	tgaagagtgc	_	gtc
ggggtttctt	ctttatttga	aacactggtg	tcc
cctcaggaag	tgctggcgcc	cactcctgga	aag 40
agaggctggg	cgtgcattac	tcagcaaatc	ctt

cccactcact

```
<210>2
<211> 18404
<212> DNA
<213> Homo sapiens
                                               10
<220>
\langle 223 \rangle genomic DNA
<400>2
tctccctgac
            cagcctccta
                         agttccagga
                                     ggt
gggggctctg
             taaggatttg
                         ctgagtaatg
                                      cac
                                               20
gctgtctcag
             cctttccagg
                         agtgggcgcc
                                      agc
tttactcccc
             aggacaccag
                         tgtttcaaat
                                      aaa
                                      ttc
aaggaagagg
            ggacaaaaaa
                         caaagcactc
caagaggata
            agggcagcag
                         cggcctggat
                                     gag
ctgaggagcc
             tgtccctgtt
                         cccgccagag
                                     ggg
                         cttcttagtt
            gttaactact
gcttccggct
                                      cag
gatcagggcc
             cccctgaggg
                         tggccccagc
                                      tgc
                                               30
ggggtcagac
             agcctgggtt
                         cgaatcccag
                                      cct
gcaagtgacc
             aagttactta
                         gtttttctgt
                                      c c c
tgacagaagt
            gcctagactg
                         aactaacgtg
                                     tgt
agcgtgtgat
            gagtcactgt
                         gcccgtctta
                                      tcg
accaccctgt
             tatgatcgcc
                         ctccatttta
                                      aag
tcaccctccc
             acgtgcgagg
                         cggagtcccg
                                      acc
ttcacgcgag gcacgcacgg
                         aggcacacac
                                      agt
```

agggctcaga

ggc

gggcaagcaa

tacaagagga gaagggttgg	ccctgcctgg ggcctggctg	ggctatatac agggtcaggg	1080
agaggtgggg	gggatgcagc	catttaaatt	аса
ttgtgagtct	gtccatcgcg	aaatgcttcc	aca
gggagtgagg	gagtgagagg	gtagctggaa	c c t
gctgggaagc	acagaatgag	gctgcggcca	ссс
aaggacacag	ggcagggcag	ggaggacacc	cag
aggacagcac	cgctcacttc	ctcttgaggg	aac 10
gctgcttctt	cactttctcc	tccctcttgt	tct
ccttgtgtct	gcagccgggt	gcaggggggc	aag
cagcacaggg	ggacccggca	ctggcagtcc	сct
agccacggtc	cctgcactag	actccaagct	c c t
gagtgcgctg	ctggtaccta	gcagaggccc	аса
aacagaaggg	gtgagaacca	agcctgaact	tga
gtcctctcca	gaaagtgagg	atcgggctgg	gca 20
gcagtcaggg	ccactcactt	ggacgaggtg	cgg
gctgggggat	aggtgatgtt	cccgtactcc	gac
agggacagtg	ggaaggtggt	ggtcccagca	ggg
cccccccc	ccccaggccc	tgctctgcac	gca
tggtttcaat	gaactgggcg	atggccacgt	aga
ccatgcccga	gcgctgcgcc	cgcaccatct	gga
ccaggcctgg	gtggggggca	gtcaaacctc	agg 30
tgctcacccc	ccacccccaa	acccccaggt	gcc
tgagcatgtc	gatgacaatg	atggtgcctg	tgc
ggggtgccat	cagaggccag	tcaagccctc	ссс
ccagccccag	gcaccacagg	agcagcctga	gcc
ggtcaccggg	caagtgatga	tggaggtttg	ссс
ggctctgcgg	tgctgacgct	ggctccccag	ctg
gcgccgactc	ctcactccta	gtgagtggct	gcc 40
aatcccacca	ctgtcctgcc	ggctcccagg	tac 40

ggagttatgg agcgtctctc	agcatggctt cacttccctt	ttccttcaaa ccctgacgtc	2820
agggaaagga	tagccctgag	acagcagggt	gcg
agcagtgcag	taggaagttt	ctctcctttc	сса
ccccaggccc	accctcagct	gagcccagca	agc
tcaaacccag	attgtcaaaa	ataacccccc	aca
aaaggccatg	gggctttcaa	gaagtgtgtg	aat
agctctcggg	gatgggcctg	tccctgagag	agc 10
cccatcgggg	gcacctctag	attcagccga	ctt
ggggaagagg	aggaagccag	aggccgtcgc	agg
ggaccggggc	aaggcaggtt	cccattcccc	tat
agtaacagcg	cccagtttt	gagggctgac	gga
tgagttctca	cgacaaccct	gagatcctga	t t t
aagttaagta	atttgtccaa	gaccacacag	ctg
cctctcatcc	acccaggcca	ggccagctca	gtg 20
cttgcagccc	ccacctctgc	accttaccag	agg
tagacagagg	agttatgtgc	agccccaaag	aag
ggccaggatg	gggcactgcc	tggggaagct	ggg
aagccctgcg	gctaccgatg	gaaaaagagg	agg
tcctgggaga	agaaaccaac	agaatgggac	ctc
ggcctactgt	gggtgcctgc	ccggccttgc	cct
ggtcccgggc	tcctcctctg	tatttggcag	ggt 30
ctctgaggaa	gatacccaca	ggcagagggc	саа
cccagggttc	tggagccatg	aggggaccca	gga
aatgtgcgag	ctaacgttta	tattgcttat	аас
tctcagctgt	cactactacc	atcaggatta	tca
ccctgcgtga	ggcagacttt	cctgccgctg	gtt
cccaggctca	ctggggaccc	catggtcggg	сса
ccgaatcagg	tctccctaag	ccgaggacat	agg
cctcatccat	ctcaccctac	ccgaccagag	agg 40

aatggggcag ggcgtgg	gg ccactcacat tgtccagcgg	ggagaccigt aaggiacgga	4560
gtttgtatt	ggttgtgtca	tgctccccgc	agt
gctgcatgc	cacctcgggc	cagtatggga	сgс
ggggatgag	g cacagagcag	ggcactgtgg	ссс
tgcctggca	cggcccaaac	atttgttgga	tgg
acctgggct	c tcgtctcaga	tcaaccacca	aca
ccggtacat	cgtttgtcat	tcaacaaacg	ttg 10
tgcaaacca	e acagcttcac	agacacaaat	aac
gagctcaca	g agacaggtga	ccgggggaga	cac
cgtaattct	cctctaggtc	ctggaggaaa	саа
tccggctgt	g tcttcaaaaa	cgaggcatct	gcc
ttcctagca	g aaaatgagct	tgtgcaaaga	aag
ctgggggcg	g tgagccttca	agagaagcgt	gcg
atgccaggc	c ttagagtgcg	actttatccc	a a a
cagaaagga	a ggaacttgac	ccagtttgtg	tca
agagggtgc	t gtgtaggggg	agcctgcagg	gta
ggcagggag	g acaggaggg	cctggatgca	gac
gacagcctg	g aacctgggtc	tggagctcag	aag
gggtcacgt	t gtgtagtcga	gactttgtca	cta
ccctcaccc	c tgagatccct	ttctgccctg	gca
gaccacaag	c acgggggcgg	atgcggggaa	ggg 30
ctctcgggt	g gtcatgacga	tgacacggct	gtt
attgaccgt	g gcctccagac	aaccctggct	ggc
gcctagcag	c tggttctgga	cgcaagcgtg	gag
tggcccagc	a caggccctga	accactgcca	CCC
tttgcccag	c tgtctctgga	tctagggtcc	ссс
gcctctcct	c ccacgtggcc	cacactgctg	асс
gacccgggg	a tgttactgtc	ccgtccctgc	agg
gggcggaga	g gaggcgagat	ggtctgggtt	agc

```
cctcctgagc taacaggcca ttctggtctc agaagccatg aggcttgcgg gggactgtgg 6300
gcagcagggg
             tgggggatca
                          tctgtatgga
                                      ggg
                          ctggtggtgg
agcagggggc
             aacctgcctg
                                      gga
ttggagaagg
             gggaggctct
                          gtgggggtg
                                       tgg
tggagacctg
             tgagatgagg
                          ggaggcagct
                                      ggg
gcagcctggg
             tgctcacagg
                                      ctt
                          ggagaatgtt
ccgctgccct
             tccagacgct
                          ggtgcaagtt
                                      ctt
                                                10
tgtgggtggg
             gaaatgagca
                          tcagctccca
                                      aag
gggtgggtca
             ggagcagagg
                          tgggcaagga
                                      ggg
             cctcagctgc
gctgccacca
                          cccagccctg
                                      ccg
ccagaagcca
                          tatcctcgga
             gccttggctg
                                      ctc
gttctcaatg
             tcagccgcat
                          tcaccctcgt
                                      ggc
agaagtcagc
             aactcagaga
                          tcccagaagc
                                       tca
                          cctgacctgc
gggaggcagc
             tgggcccacc
                                      cgc
                                                20
tcaatccccg
             tcttcttgaa
                          atgctccacc
                                      agg
ccacccactg
             tgtagcgtcc
                          accctggggg
                                      gag
gtctccctcc
             ctgggtcccc
                          agccttgaat
                                       tca
acactgtggt
             cacagacagg
                          agcctcagca
                                      gag
tcgcacatga
             ccttgatgtg
                          ggtgaccctg
                                      agc
tcactgagca
             cagaaagcac
                         gaagtctcca
                                      ggc
gtccagggct
             cgcccttggc
                          ctgcagcagc
                                      gtc
                                                30
tggtaccacc
                          agcgtcaggg
             tagagaaggc
                                      aag
ctgagcagag
             acattcacag
                          agagggccg
                                      gaa
tgcgctacat
             gcttccaaat
                          ccaccacctc
                                      att
taggtatgat
             attaccccca
                          ttttatagat
                                      gag
ggcctagggc
             ccttgactga
                          ctctagggca
                                      agc
gtgcagtggc
             gcggttacag
                          ctctctgcag
                                      cct
cctccagagt
             tctaaccggg
                          cttcgaaccc
                                      aga
                                                40
gcaatattca
             aaatatttgg
                          aggagagaag
                                      cta
```

tgtgccccag cagagaccag	aggcaaagag aaacgcagac	cgaggccaca ccacagggag	8040
tggtgggaga	tggacacaca	gactcaagtc	aca
agggaggcgg	ggaagacaac	cccactgggg	aaa
ctggatgatg	tcactgaagg	ggagcccagg	gtt
cagaaagcag	aactaagccc	tttccccgaa	gca
ccccacaaag	cccagcccca	caggaaacca	cgt
gggagagagt	gagaagtgag	gttgtgaggt	ttc 10
gcaaattttc	caaccgcagg	gatgggggga	agg
tctcacccct	gcccggaggt	gactccagcc	gag
gggctacttc	agcccaccgc	ctggggacag	gct
gagccccttc	cctcaggccc	caggatgagg	aag
aggaagcgca	gagccaccga	gggacagatg	саа
caaggcagag	gacacagcag	aacctgggag	aaa
gggtgacact	ggctcctggg	acgggtcacc	c a a 20
cttaacctcc	cgccccggca	ctgccctccc	ttc
acccaggcct	cagcctcctc	tgcaggggcc	tcc
caggcactgg	tcagcccgtc	ctcctctcct	ggc
agctttagag	ggtctcggtg	ccaaaagccc	c c t
cagggggcag	acacggagcc	agccatgtga	ggc
aggccgatcc	aggaaaggag	gcctcccagg	tgg
cagctctaag	tttcaatcag	tgccttgacc	aaa 30
tctcagagag	gctgcaagct	ggcaggagca	agg
tgaatgcagg	gatccacggc	aagggcaagt	cgg
ccctagcgtt	attccgctgc	cctttactct	aag
gaaaggagcc	atggtgtcat	gaggagcatt	cag
gggagaccac	aggaggagtc	ggggaggcca	cag
tgcccgggac	agcgtgagac	actttacaca	ggt
tctctgtttg	ggccggagac	ctatttgacc	сса 40
ctgggacaag	gcatcaagtg	tcttggcaag	cat

ctcctcactg tcctaacatg	tgctggggtg aggggcagac	ggaggaaggc aggctcgatt	9780
ccagaggaag	aagagctttc	taacaacaga	g c t
agtggcctcc	$\tt ctgtctccag$	tgggacctgg	gtt
cgaggcagct	ttctgtggct	tcctcggggt	tag
agacaccagg	tcccaggaca	gcagggagga	ggg
aggggaggg	atggagggta	ggcagcgccg	gct
cagggtggga	gccggctcat	ccctgcttgg	gaa 10
cactagtggg	atcggagcag	ttcagcgggt	act
cctgcaggac	accctgctgc	tgagtgtagt	a.c t
tctccctcc	atacaggtca	tagaaatccc	ctg
gatcccccac	cctgcagggc	accaggcggt	gag
agggcaggga	tcggctgagg	tcctgggtgg	ggg
agggatgggg	agtgtggggg	ttgggggcaa	ggg
gggaaccagg	aatgagtggt	tcagggcctg	gat 20
gggttgcggg	gggcccacct	acctgacgga	gag
gggccgagcc	aggaagctac	cgtggacacc	tcg
cccactgagg	tctcggtgaa	accacctggg	cgg
cgtgggcacc	aggcaccctt	gcctcctgtc	tac
tcctgggggc	ttccggagag	gaagggggcg	cag
caggcagaga	gctcagggac	taagcctcag	atg
acccccggtg	gtcccagttc	tggggctgcc	act
ggggacagga	agaggcgcgg	ccgacccctt	ggg
agcacagcaa	gggaagagaa	gcagagcagg	gtg
tcccacacgt	ctgcaatcaa	aggeteagga	gca tcc
gcagtaagga	cacatgtgtg	ccttgcacac atctctccct	cct
aacccagacg	gtcccacggc	tgatggcggt	gac
ctggcccacg	ctaataacaa tgtgctataa	tggcgttcac	atg
tgccgggcgc ccctatgaaa	caggggctat	ctttatcatt	t t a
ccciaigada			

tttaaggcat tgcctgagtc	catcagtgag tcagctgcag	tgccaggatt caaacccaga	11520
cagtccggtt	ccaaagccag	tgctttgaac	tcc
aacagagatt	aagagcctcc	ttgtccaaag	ggg
taagaccttg	ccaatgcttg	caagagagaa	ggg
ttgtccatgc	cactgtggca	gagggatgga	caa
gggtcctttc	taattcttgt	ccctaggcct	ctg
cctatctcct	gggggctggg	ggacaaggtc	ctc 10
tgatcttaga	ggccctaaac	actaaggtat	atg
aaacatcaac	accgccaaac	caaaacgagg	aaa
acacatattg	gtggcttccc	ctagggaggg	aaa
gagacacttg	gttctctaca	tacctttttg	aat
ataaaaataa	atatgctaac	tgggaacaat	ttc
ctctttgtct	ctatctggat	gctgtttgca	tgg
cgcagtggct	cacgcctgta	atcccagcac	t t t
gtcaggagat	cgagaccatc	ctggccaaca	tgg
aaaaaattag	ctgggcatgg	tggtgggcgc	ctg
caggagaatc	acttgaaccc	aggaagccga	ggt
actccagcct	ggcaacacag	taagactcta	ttt
ttgtgtgctt	aatatttatg	aacattatgc	atg
ttttaagccc	aacaagtcta	attttcccat	gat
aaacatcaat	gttttccccc	aaaaaaggct	t t t
atttgtttct	ggttttcttc	tctcactggt	gcc
gcatggtcca	gctttgacta	ccccttcagc	ttg
gcggaacccc	cacgcccaac	gccaaggagc	aag
gcgggacacc	cgctggcgct	ctcgctcatc	tcg
ggcactgagc	aagtgttcaa	caaacaagct	cgt
agtacagctt	cctggtccta	cacacacagc	ctg
cacagtcaca	gcacacacac	ctcatcatcc	atg 40
gcacatcccc	acgcatggaa	cataaatctg	acc

r cetøøreres agaractert		# DOGO
corporate apacaeres	tccagggctt aaacccactt	13260
aattaactcg	gcacccagaa	gaa
aggaattcct	ctgaagggtg	tca
tgctatcctt	tggcaggaaa	ata
tgcagatcac	tttcacatac	acg
atcattttcc	ccattttctt	atg
gtaaatgcct	gataattcag	aag 10
gagatcaagg	ccaggcgcag	tgg
ctggtggatt	acttgacacc	aag
tctacaaaaa	atacaaaatt	tag
tgggagactg	agatgggagg	atc
ggttgtgcca	ctgtaatccg	gcc
atacagctgg	gcgcagtgac	tta
aggatcactt	gaggtcagga	gtt
actagcctgt	aatcccagct	tct
ccgcactcca	gcctgggcaa	cag
catacagatc	aagatcaatg	gtg
caaaataatc	tgtagaaagt	tct
tgagcttaac	aatatttccc	aaa
tgctgccagc	ttttacatta	tac
ttcacccaat	tttagaaaca	gaa a
acaagctagt	gagtaggaag	gtg
ctttccccca	acaaccatac	tgc
cacagcccat	gatggaaggt	gga
caaagaggtg	gcacgcacag	agt
gctggagcaa	agttgttctg	aga
gctgagaaac	caaggatgaa	atc
aaatgaccac	agacgggatc	agg 40
gacagtgaca	agatgtgcac	tgg
	a a t t a a c t c g a g a a t t c c t t t g c t a t c c t t t g c a g a t c a c a t c a t t t t c c g t a a a t g c c t g a g a t c a a a a a t g g g a g a c t g g t g t g c c a a t a c a g c t c c a a t a c a g c t c c a c a t a c a g a t c c a a a a t a a t c t g a g c t t a a c t g a g c t t a a c t g a g c t t a a c t g a g c t t a a c t g a g c t c a a t a c a a g c t a g c t t c a c c c a a t c a a a g c t a g g c t g a g a a a c a a a t g a a a c a a a t g a a c a a a t g a c a c a a a t g a c a c a a a t g a c a c a a a t g a c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c a a a t g a c c a c	aggaattcct ttgaagggtg tgctatcctt tggcaggaaa tgcagatcac tttcacatac atcattttcc ccattttctt gtaaatgcct gataattcag gagatcaagg ccaggcgcag ctggtggatt acttgacacc tctacaaaaa atacaaaatt tgggagactg agatggag ggttgtgcca ctgtaatccg atacagctgg gcgcagtgac aggatcactt gaggtcagga actagcctgt aatcccagct ccgcactcca gcctgggcaa catacagatc aagatcaatg caaaataatc tgtagaaagt tgagcttaac aatatttccc tgctgccagc ttttacatta ttcacccaat tttagaaaca acaagctagt gagtaggaag ctttcccca acaaccatac cacagcccat gagtaggaag ctttcccca acaaccatac cacagcccat gatggaag ctttcccca acaaccatac cacagcccat gatggaag ctttcccca acaaccatac cacagcccat gatggaag ctttcccca acaaccatac cacagcccat gatggaag ctttcccca acaccacag gctgagaaac caaggatgaa aaatgaccac agacgggatc

caagaatcag cagggctagg	gagccaccca cccacaaac	cgccagtact ctgtaagcag	15000
gttgtcactt	tttcttttct	tttttttt	ttt
caggctggag	tgcagtgacg	caatctcggc	tca
caattctcct	gcctcagcct	ccctagtagc	tgg
gcctaatttt	ttttttgtat	ctttagttga	gac
tcttgaactc	ctgacctcgt	gatccacctg	c c t
gcttgagcca	ccatgcccag	ccggttgtca	ctt 10
$\tt ctttttctt$	ttctttcctt	tcttctttcg	a c t
ttcttttctt	tctttccttc	cttccttttc	t t t
cttctttctc	tttttctttc	ttccttccct	tcc
ttttttgac	acagaatctt	gctttatcac	сса
tcactgcagc	gtcgacctcc	ttggctcagg	tga
tgagaccaca	ggtgcatgcc	actacatcca	gct
tcgtagtaga	gatgaggtct	ctccctatgt	tgc 20
aagtgatcct	cccacctcag	cctcccaaac	tgc
tacccagtat	tttttttaa	tagagatggg	gtc
actcctgagc	tcaagcaatc	ttcccccttc	ggc
gcgccacctc	atctcgtcag	gttttcactt	tca
tgctgtggcc	ctgcctccgc	tccactaggg	tcc
tgtttgttcc	cacattaggg	ctttgtgctc	асс
cttgatcact	acgtcacatg	gccagctcct	c t t
gtcacctcct	cgggaaggcc	tccctgatcc	ctc
gtcacttgct	agcatatgaa	gctggttcat	t t t
gtctcactct	gtcgcccagg	ctggtgtgca	gtg
acctcccagg	ctcaagcaag	cctctcacct	tag
tgtgccacca	cacccagcta	atttcttatt	t t t
ccaggctggt	ctcaaactcc	tgggctcaag	саа
tgggatcaca	ggtgtgaacc	actacacccg	g c c
tctgagaatc	tgcaatgatc	caatttattg	ggt

o	gaa	tσ	t o :	9 CT	C	t c	rσ	tσ	9 0 79	σr	9 0	9 0	a C i	r a	ts	z t i	c te	or t	ctt	øt:	t۰	ar	tr	rя	g	tat	t t :	ac.	:20	16	741	ח		
	saa Ca									a										g										t				
											_								a	a										g				
•	g c																													c				
	gt																		a										g G	g				
	tg												g									g												
	ag																		g			a								a				
	t t																		g			t								c _				10
	a a																		a			g	_							g				
	cg																		a			g								t				
	СС												g									С								a				
į	gg	С	g	g	a	g	g	g	С	С	g	С	a	g	g	g	g	g	С			g								С	a	g		
1	СС	a	g	g	t	g	a	g	g	a	a	g	а	a	С	C	g	С	t	С	a	g	t	а	a	t	С	a	g	С	С	а		
1	c a	a	t	g	g	С	a	С	t	g	С	a	g	g	g	a	С	a	a	a	C	С	С	t	g	g	a	С	t	a	a	t		
	g g	g	g	С	t	g	g	С	С	C	g	a	g	a	С	С	g	С	С	С	a	С	a	g	C	g	g	С	С	a	g	С		20
	a g	С	a	g	g	c	С	С	g	С	С	t	g	c	t	g	g	t	С	С	a	g	g	g	c	С	g	С	С	t	t	c		
	c t	С	С	a	С	С	t	g	g	а	g	С	t	С	a	a	g	С	t	g	a	С	a	g	a	g	С	g	g	С	g	g		
	a g	t	a	a	c	С	С	t	g	g	С	t	g	a	g	g	a	a	g	a	g	С	a	a	c	С	a	a	t	g	g	g		
	a g	g	g	С	С	t	a	a	g	g	a	a	a	a	t	С	C	С	t	a	a	С	a	g	С	С	С	a	g	t	t	C		
	g g	c	С	С	a	С	С	c	a	С	С	С	a	g	g	g	С	g	С	t	g	а	g	g	g	a	С	С	С	a	С	t		
	gg	g	g	a	g	g	а	g	C	С	t	С	a	g	g	t	а	g	g	g	t	t	a	g	g	С	С	С	t	g	g	g		
	g g	g	a	g	g	a	g	С	t	g	t	t	С	a	g	g	g	g	g	a	t	g	g	g	g	С	С	t	g	g	a	a		20
	t g	g	g	g	g	t	t	g	t	С	а	g	g	t	С	С	g	С	а	a	g	а	g	а	С	t	g	a	С	a	c	С		30
	t t	g	t	С	t	g	g	a	a	С	а	t	С	a	a	g	g	С	С	t	t	t	С	С	t	С	С	С	С	t	g	g		
	аg																												g	g	С	С		
	ga																												С	t	g	g		
	aс																		С										С	С				
	tc																		t										g			g		
	cc																		t										a			g		
	gt																													g				40
	5 l	, L	L	5	5	a	. ե	8	, a	L	5	a	. •	a	L	L	L	5	5	L	•	·	a	·	ш	~	L	5	0	5	٠	<u></u>		

DNA

```
⟨210⟩ 3

⟨2 1 1⟩ 1 7 9 4

⟨2 1 2⟩ DNA

⟨2 1 3⟩ Homo sapiens

⟨2 2 0⟩

⟨2 2 3⟩ complementary

⟨4 0 0⟩ 3
```

atgctgtccc gtgggtggtt tcaccgagac ctcgtgtccacgg tagcttcctg gct aagggccgag gtg ttctcgctct ccgtcagggt gggggatcag ttt acctgtatgg aggggagaag gatttctatg cctgcaggac cgc tacactcagc agcagggtgt cactagtgag ccgctgaact gctccgatcc agg caggcagaga cgctgctgca ggccaagggc gag cgtgctttct gtg ctcagccagc ctggagactt tcagggtcac ccacatcaag gtc ggctccccgc cagcctcacg ggtggtttgg agaccttcga gac ctttgtctac ctg cctcaggcgc attgaggagg aatgcggctg acattgagaa ccgagtgttg gaa ctggcttctg ggaggagttt gag acagccaagg gtctggaagg gcagcggcca gag ttgcaccagc ccgagtgatc ctg attctcccct ttgaccacag tcaatgccaa ctacatcaag aac tccgactaca gggctgtctg aagacctaca tcgccagcca gag tgtcatcgtc atg gcgtggcagg agaacagccg aacaaatgcg teccatactg geeggggtg ggeatgcage gtgettatgg geectactet 1140 gtgaccaact gcggggagca tgacacaacc gaa

20

10

30

atggagacct gattcgggag atc ccgctggaca gcctgggggt gtc gaccatgggg tccccagtga gtctgcctca cgcagggccc atc cggcaggaaa ctccgcacaggca ccatcattgt catcgacatg gactgtgaca ttgacatcca gaagaccatc cag caagttcatc tac aggcgcagta gtgcagacgg cctgcagtcg cag actaagaaga agctggaggt gaagaatgcc cat atcacctatc ccccagccat act atgtgtatga gaacctgcac cacaaggagg aag aagcagcggt cagcagacaa ggagaagagc

10

<210>4

<211>595

<212> PRT

 $\langle 213 \rangle$ Homo sapiens

20

<400>4

Met Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser

1
5

Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser 20 25

30

Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser
35
40

Thr His	Ile Arg	Ile (Gln	Asn	Ser	Gly	Asp	Phe	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Gly
	50									5	5		

Gly 65	Glu	Lуs	Рhе	Ala	Thr 70	Leu	Thr	Glu		
Gln	Gln	G1y	Va1	Leu 85	G 1 n	Asp	Arg	Asp	·	10
Туг	Pro	Leu	Asn 100	Суѕ	Ser	Asp	Pro	Thr 105		
H i s	Met	Ser 115	G 1 y	G 1 y	Gln	Ala	G 1 u 1 2 0	Thr		20
Pro	Trp 130	Тhг	Phe	Leu	Val	Arg 135	Glu	Ser		
Val 145	Leu	Ser	Va 1	Leu	Ser 150	Asp	Gln	Pro		
Leu	Arg	Val	Thr	His 165	Ile	Lys	Val	Met		30
Va 1	G 1 y	G 1 y	Leu 180	Glu	Thr	Рħе	A s p	Ser 185		
Рhе	Lys	Lys 195	Thr	Gly	Ile	Glu	G 1 u 2 0 0	Ala		40

Arg Gln Pro Tyr	Tyr Ala	Thr Arg	Val Asn	Ala Ala	Asp	Ile Glu Asn
210					2 1	5

Arg 225	Va1	Leu	Glu	Leu	A s n 2 3 0	Lуs	Lуs	Gln	
Ala	G1y	Phe	Trp	G 1 u 2 4 5	G1u	Phe	G1u	Ser	10
Asn	Leu	His	G1n 260	Arg	Leu	Glu	G 1 y	G l n 2 6 5	
Asn	Arg	Туг 275	Lys	Asn	I 1 e	Leu	Pro 280	Phe	20
Gln	G 1 y 2 9 0	Arg	Asp	Ser	Asn	I 1 e 2 9 5	Pro	Gly	
Туг 305	Ile	Lуs	Asn	G 1 n	L e u 3 1 0	Leu	G 1 y	Pro	
Ile	Ala	Ser	Gln	G l y 3 2 5	Суs	Leu	Glu	Ala	30
Met	Ala	Тгр	G 1 n 3 4 0	Glu	Asn	Ser	Arg	V a 1 3 4 5	
Val	Glu	Lуs	Gly	Arg	Asn	Lуs	Суѕ	V a l	

Met	Gln 370	Arg	Ala	Туг	Gly	Pro 375	Туг	Ser	
Asp 385	Thr	Thr	Glu	Туг	Lys 390	Leu	Arg	Thr	
Asn	Gly	Asp	Leu	I 1 e 4 0 5	Arg	Glu	Ile	Тгр	10
Pro	Asp	Ηis	G1y 420	V a 1	Pro	Ser	Glu	Pro 425	
Leu	Asp	G l n 4 3 5	Ile	Asn	Gln	Arg	G l n 4 4 0	Glu	20
Ile	I 1 e 4 5 0	Val	H i s	Суѕ	Ser	A 1 a 4 5 5	G 1 y	Ile	
Val 465	Ile	As p	Met	Leu	Met 470	Glu	Asn	Ile	30
Asp	I 1 e	Asp	Ile	G 1 n 4 8 5	Lуs	Thr	11е	Gln	
Gly	Met	Val	G l n 5 0 0	Тhг	Glu	Ala	Gln	Туг 505	

20

30

40

Ala	Gln	Phe I	[le	Glu 51		Thr Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Val	Leu	Gln 5 2			
G 1	n	Ly:		G 1	У	Gln	G 1	u	Se	r	G 1 5 3		Ту	r	Gly	
3.5		T		۸		41 –	TT 3	_	A 1	_	т		A 1	_	C = #	

Met Lys Asn Ala His Ala Lys Ala Ser 545 550

Glu Asp Val Tyr Glu Asn Leu His Thr 565

Val Lys Lys Gln Arg Ser Ala Asp Lys 580 585

Lys Arg Lys 595

<210> 5 <211> 18404 <212> DNA <213> Homo sapiens

<220>
<223> bisulfited genomic DNA

<400>5 ttatttagtt gtgtttagtg tagattaaat gtt

ttgtatgcgt tttgtttggt	aaatagitgi itagitagig	ggggagtagt ttatgtttag	120
attattattt	tttttaggtg	ttttaggtac	gtt
$a \; t \; $	gtaggtgttt	ttaagtttgt	tcg
ttttgagatc	gttagtttgt	taggtaagtt	gaa
gttattttat	gggtttgttg	ttggtggtag	cgt
ttgtgttatt	gttaggggag	gaaaggtttt	gat
gatttagttt	tggtgttagt	tttttgcgga	t t t
tttttttgtt	tttttaggtt	ttatttttt	gaa
tttaattttg	ttttagggtt	taatttatt	tga
tgagaggttg	gagtgggttt	tttagcgttt	tgg
tttttttga	ggaattgggt	tgttagggat	t t t
gagaggtttt	ttttattggt	tgttttttt	tag
tatttaatat	ttcgtcgttt	tgttagtttg	agt
ttttttcggg	ggaaggcggt	tttggattag	t a g
gttgtaggga	agttggtcgt	tgtgggcggt	ttc
ttttggagat	tattagttta	gggtttgttt	ttg
cgaggaggaa	gtggttgatt	attgagcggt	t t t
tagttgtgtc	gttggtttag	tttcgttttt	tgc
tatagagaga	tgttgtttcg	tgggtaagtt	tcg
tagttttgga	gggagggagg	gttttgttga	tgt
cgatttgtcg	ttgttttgcg	tttgttttcg	gtt 30
gtgaggattt	tcggtttatt	tatgttttt	tgt
agtgtgtatt	tgttttttt	attgtatttt	tat
tttttgttta	ggatttgttt	ttttgggtag	t t t
gttattcgcg	aaggttttt	tacgtttagt	taa
ttggttttat	ttttttgtt	tttttttatt	t t t
gtacgtgttg	agtattatt	atgtattagg	tgt
gaataagata	gatatggttt	ttgtttttac	gga
tcgaataaat	aatttaataa	attggattat	t g t

tagatagitt iggicgggig	tagtggttta tatttgtgat	tttagtattg tgggaggttg 1860	
aggcgagagg	attgtttgag	tttaggagtt tg:	a
ttgtttttat	aaaaaataag	aaattagttg gg	t
ttatggagag	gttaaggtga	gaggtttgtt tg	a
gatgattgta	ttattgtata	ttagtttggg cg	a
aaaaaaaaa	gaaaatgaat	tagttttata tg	t
attattagtt	ggaggatta	gggaggtttt tt	C 10
ggatgaggag	gaagaggagt	tggttatgtg ac	g
gtagaggaga	tggtgagtat	aaagttttaa tg	t
ttcgtggtag	aggattttag	tggagcggag gt	a
agttaggatg	ttgaaagtga	aaatttgacg ag	a
tattttggga	ggtcgaaggg	ggaagattgt tt	g
taatatagag	agatttatt	tttattaaaa aa	а
tggtagtttt	agtagtttgg	gaggttgagg tg	20
gattattttg	ggtaatatag	ggagagattt ta	
tattaataaa	tagttggatg	tagtggtatg ta	•
aggtaggagg	attatttgag	ttaaggaggt cg	
gtattttagt	ttgggtgata	aagtaagatt tt	
gaaggaaaga	aggaaggaa	ggaagaaaga aa	
cgagaaagaa	gaaagaaaag	gaaggaagga aa	_
aagtgatatt	tagtcgaaag	aagaaaggaa ag	30
gaaaaaagaa	aaagtgataa	tcggttgggt at	
	gaggtaggtg		
ggtgaaattt		aaagatataa aa	
atttgtgagt	tttagttatt	agggaggttg ag	
ggaggttgta	gtgagtcgag	attgcgttat tg	
ttttattta	aaaaaaaaa	aaaaagaaaa ga	
	tgggtgggtg	gttttttagt tt	40
ttgtttttgt	tttagtgtat	attttgttat tg	τ

gttttttggt ttttgatttc	gttigiggti attititgt	taggtagttt ggttaggttt	3600
ttttggtgt	agattttatt	tttggttttt	tag
gggtttttat	tttttagaat	aattttgttt	tag
tgtttatgtg	gattttgtgc	gtgttatttt	t t t
gtatttttt	ttttatttt	tattatgggt	tgt
cgttgtttgt	tgtagtatgg	ttgttggggg	aaa
cgtgttttat	ttatttttt	atttattagt	ttg 10
tgagttttag	tttttgtttt	taaaattggg	tga
gaggattaat	agtataatgt	aaaagttggt	agt
ttatattagt	atttgggaaa	tattgttaag	ttt
agagtagttt	tagaattttt	tatagattat	ttt
tttttttgta	ttattattga	ttttgatttg	tat
ggagttttat	tttgttgttt	aggttggagt	gcg
tttattttt	gagaagttgg	gattataggt	tag 20
agttggtttc	gaatttttga	tttaagtga	ttt
gattataggt	gtaagttatt	gcgtttagtt	gta
tttgttattt	aggtcggatt	atagtggtat	aat
taggtttaag	cgatttttt	attttagttt	t t t
attatatttg	gttaaatttt	gtatttttg	tag
ttgtttttaa	atttggtgtt	aagtaattta	tta
ataggcgtga	gttattgcgt	ttggttttga	t t t
aatattttt	ttttttgaat	tattaggtat	tta
ttgtttttgt	ttataagaaa	atggggaaaa	tga
ttaaatgaga	tcgtgtatgt	gaaagtgatt	tgt
aggtagtttt	ttatttttt	gttaaaggat	agt
gttttttggt	ttgatatttt	ttagaggaat	t t t
gtttagttag	tttttttgg	gtgtcgagtt	aat
tggaaggagt	gttttggggt	tagggtgtag	t g g
atttcgtgtg	tggttagatt	tatgttttat	gcg 40

gtgtaggtgg atatggatga	tgaggtgtgt gtgttgtgat	tgtgtgtgta tttttgtttg	5340
cgtatgataa	gtaggttgtg	tgtgtaggat	tag
gttatggatt	gacgagtttg	tttgttgaat	att
tttgaatatt	tcgagatgag	cgagagcgtt	agc
tatgtgtttt	ttttgtttt	tggcgttggg	cgt
ggggtggtgt	ttaagttgaa	ggggtagtta	aag
agattttta	gggtattagt	gagagaagaa	aat 10
aagaaaagtg	gaaaagtttt	ttttggggga	aaa
ataatgtagt	tattatggga	aaattagatt	tgt
ttgaagtaga	atatgtataa	tgtttataaa	tat
tttttttt	gaaatagagt	tttattgtgt	tgt
ggttcgttgt	aattttggtt	ttttgggttt	aag
agttgggatt	ataggcgttt	attattatgt	tta
agggggtttt	attatgttgg	ttaggatggt	t t t
tttggttttt	taaagtgttg	ggattatagg	cgt
tttatatata	tttatgtaaa	tagtatttag	ata
aaagttttt	agaaattgtt	tttagttagt	ata
tattatataa	tatttaaaaa	ggtatgtaga	gaa
tagttattta	gtttttttt	ttaggggaag	tta
gttgagttgt	ttttttcgt	tttggtttgg	cgg
gtaggtagta	ttatatattt	tagtgtttag	ggt 30
ttagttatgg	tgaggatttt	gttttttagt	ttt
ttggggtagg	gtagaggttt	agggataaga	att
ttagggttat	gttgtttatt	tttttgttat	agt
agaggagggt	atttttttt	tttgtaagta	ttg
ttttatggta	gtttttttgg	ataaggaggt	ttt
gttggtgtat	aggagtttaa	agtattggtt	ttg
ggtattgtag	ttgatttatt	gatggattta	ggt
ttttttgttt	gtaaaatgat	aaagatagtt	ttt

attogatong gtatgtgane	gttattatag tatagegtte	ootatttagt aggatttatt	7080
cgatgatagt	tgttatcgtt	attattgtta	tta
gtagttggtg	gaggaggag	agatgtcgtg	gga
tatttgggtt	tggagtgtgt	aaggtatata	tgt
	atgtttttga	gtttttgatt	gta
gtgtaatgtt attttagtg	ttattttgtt	ttgtttttt	ttt
aagtgagttt	ttttaagggg	toggtogogt	t
taggttagtg	gagtggtagt	tttagaattg	gga
-	gtatttgagg	tttagttttt	gag
attgggagtt	tttgcgtttt	tttttttt	gga
ttttttattt	ggtagatagg	aggtaagggt	gtt
tgttatttac	gtcgtttagg	tggttttatc	gag
ttttgtttgg	tcgaggtgtt	tacggtagtt	ttt
tgtttaaggg	gtttttcgtt	aggtaggtgg	gtt
gtgatttttc	tatttaggtt	ttgaattatt	tat
ttttttgtgt	ttttttgttt	ttaattttta	tat
tttcgtttgt	gtttttattt	aggattttag	tcg
gtttatgtgt	ttttatcgtt	tggtgttttg	tag
tatcgattgg	ttaggggatt	tttatgattt	gta
gatttagaat	gagtattata	tttagtagta	ggg
agagttggtg	aagtattcgt	tgaattgttt	cga
tatttattt		agggatgagt	cgg 30
tattttcgtt	attttaagt	tgtttatttt	tta
gggagattgg	tagtcggcgt	ttgttgtttt	
gtttttaatg		aggaagttat	ggg
attttttta	tttaatttcg	tttattggag	aga ata
ttggtcgttg	taatttaggt	gttagaaagt	ttt
tcgtgtaggt	tagttttgtt		
tttcgtttgt	tttttattt	agtatatgtt	agg
gatggggatg	aatgtttgtt	aagatatttg	atg

	(80)	Jf	2004 120 A 2004. 1. 0
ggtttgtttt gtggggttaa	ataggititc ggittaaata gag	attattg agagtacgat	8820
gtgaagtgtt	tatttgtgta aa	agtgtttta	cgt
gtatttttt	tttgtggttt ti	ttcgatttt	ttt
ggttgggggt	tttgaatgtt ti	tttatgata	tta
tgttagattt	ttttagagta aa	agggtagcg	gaa
tttgggttaa	gtcgatttgt ti	tttgtcgtg	gat
atgatcggga	attttgtttt tg	gttagtttg	tag 10
gtattaatat	ttttggttaa gg	gtattgatt	gaa
agttttgtgg	tttatttggg ag	ggttttttt	ttt
tttttttgtg	agttttatat gg	gttggtttc	gtg
tcgtaatatt	tagggggttt t	tggtatcga	gat
ttttgtttt	agttaggaga gg	gaggacggg	ttg
gtagggtttt	aggaggtttt tg	gtagaggag	gtt
agagagaa	ggaaggagg g	tagtgtcgg	ggc 20
tggaggtttt	tttgggtgat to	cgttttagg	agt
gtgagaggtt	tttttttta g	gttttgttg	t g t
tttgcgagaa	tttgtatttg t	ttttcggtg	gtt
ttgtatggag	attttttat t	ttggggttt	gag
tttggggttt	tagtttgttt t	taggcggtg	ggt
tttgggggtt	tttcggttgg a	gttattttc	ggg
ggttttttt	tttttttt t	atttttgcg	gtt
tttgggttga	ggaaattta t	aatttatt	ttt
tttttttat	tacgtggttt t	ttgtggggt	tgg
ggaaaggggt	gtgtttcggg g	aaagggttt	agt
aaattcgttt	gaattttggg t	ttttttta	gtg
ttatattatt	tttttttag t	ggggttgtt	t t t
ttcgttttt	ttgtgatttg a	gtttgtgtg	t t t
ttcggtttgc	gtttttttt g	tttttggtt	t t t
agatttattt	ttagttttt t	ttttaaat	att 40

tagaggtggg tittgggttc	gaagttcggt	tagaattttg	g gaggttagga tggtttgaat	10560
ttgggaggtc	gaggt	tgtag	agagttgtaa	tcg
gagttttgga	agttt	gtttt	agagttagtt	aag
gcgttagttt	tttta	tttat	aaaatggggg	taa
tgagagattt	aaatg	aggtg	gtggatttgg	aag
aggtgtttga	ttttc	ggttt	ttttttgtga	atg
ttgggtttta	tttt	tttga	cgttgtttt	t t t
gggtaggtag	agacg	ttgtt	gtaggttaag	ggc
agttttagtt	agttt	ggaga	tttcgtgttt	t t t
ttaggttttt	cgttt	agggt	tatttatatt	aag
ggcggggag	t t t t t	gttga	ggtttttgtt	tgt
ttgtttgggt	ttgaa	tttaa	ggttggggat	tta
gtttaatttg	gtttt	tttta	gggtggacgt	tat
agttttacgg	atttg	gtgga	gtatttaag	aag 20
tttgtttatt	tgcgg	taggt	taggggtggg	ttt
ttttttagat	gtgag	ttttt	gggatttttg	agt
agtcgtatta	tgtta	cgagg	gtgaatgcgg	ttg
ataagaagta	ggagt	tcgag	gatatagtta	agg
atggtgggga	tcggt	agggt	tggggtagtt	gag
cggatatttt	t t t t t	ttttg	tttatttttg	t t t
atggatgttt	t t t t t	gggag	ttgatgttta	t t t
agtaggaggt	gaaga	atttg	tattagcgtt	tgg
agaatcgtta	taaga	atatt	ttttttgtg	agt
atcgtttttg	tttta	gttgt	tttttttat	t t t
gggttatttt	tttat	atttt	ttatagagtt	t t t
ttagaagtgt	t t t t t	tatta	ttagtaggta	ggt
attttttat	tttt	ttata	tagatgattt	t t t
gttttatggt	ttttg	agatt	agaatggttt	gtt
gtgagttttt	ggtta	attta	gattatttcg	t t t

agtcgagtga ttttgtaggg	acgggatagt aataitticg	ggttcgatta tattaatgtt	12300
aattatatta	aggttagtag	tgtgggttac	gtg
tttgtttggt	gggggattt	tagatttaga	gat
tgtatgggtg	agggtggtag	tggtttaggg	t t t
ggggtgcgtt	tttttacgtt	tgcgtttaga	att
agatttatat	cgttagttag	ggttgtttgg	agg
cgtggtagga	gaatagtcgt	gttatcgtta	t g a 10
tagggcgttt	tttttttc	gtattcgttt	tcg
gagtagttag	atgttagggt	agaaagggat	t t t
aaattgaggg	ttagtgataa	agtttcgatt	a t a
atttttgggt	tttttgagt	tttagattta	ggt
ttgttttatt	tgtttgtatt	taggttttt	ttg
agtttgtttt	ttattttgta	ggttttttt	ata
gattttattc	gtgatataaa	ttgggttaag	t t t
ttttggttat	ttttgggata	aagtcgtatt	tta
tttttttgat	tcgtatgttt	ttttgaagg	ttt
aggtttttag	ttttttttg	tataagttta	ttt
tatttttgtt	tggtagatgt	ttcgtttttg	aag
gaatttaggt	tttgttttt	ttaggattta	gag
tttttagcgc	ggtgttttt	tcggttattt	gtt
atagattggg	tgttatttgt	gtttgtgaag	ttg 30
gtttgttttg	gtaacgtttg	ttgaatgata	aac
gttttattat	ttgttggtgg	ttgatttgag	acg
agtttattcg	tttatttaat	aaatgtttgg	gtc
ggatttggga		tgttttgttt	tgt
ttagaataaa	tgcgttttat	attggttcga	ggt
ttttgtgatt	aattgcgggg	agtatgatat	a a t
tttttcgttg		gtggttttta	cgt
ggatttgttt	tttttttgg	tcgggtaggg	tga

ggggtattga ttttatgttt	tcggtttagg gagatttgat	tcgggagatt tggtattatt	14040
agtatttgag	ttggttcgat	tatggggttt	tta
tggattagat	taattagcgg	taggaaagtt	tgt
gtaggtgagg	atgataattt	tgatggtagt	agt
tgttatgagt	tgttataagt	aatataaacg	tta
ttttcggttt	tttttgggtt	tttttatggt	t t t
ttagttttat	tttggttttt	tgtttgtggg	t a t
tatttcgttt	aattttgtta	aatatagagg	agg
ttaagttagt	tagggtaagg	tcgggtaggt	att
cgttttttt	cgaggtttta	ttttgttggt	t t t
tgtttttat	tttttttt	tttttatcgg	tag
ttgtttttt	ttttagtttt	tttaggtagt	gtt
gatgggtgat	gtttttttgg	ggttgtatat	aat
tgattaggag	atttttggta	aggtgtagag	gtg 20
ataggtgagt	ttattgagtt	ggtttggttt	ggg
ttttcgttta	ttagttgtgt	ggttttggat	aaa
ttttatttgt	aaaattagga	ttttagggtt	gtc
gtggttggaa	tttcgttagt	tttaaaaat	tgg
ttaggtagag	aataggggaa	tgggaatttg	t t t
tggattttag	gtttgcgacg	gtttttggtt	t t t
tgggataggg	taagtcggtt	gaatttagag	gtg
ttttgttttg	tgtttttta	gggataggtt	t a t
gttatatata	tatttatata	tttttgaaa	gtt
aaggaagtgg	gtgtgggggg	ttattttga	taa
ttagggtatt	agtttgttgg	gtttagttga	ggg
ttgtttaggg	ttgggaaagg	agagaaattt	t t t
ttttgtgttt	tcgtattttg	ttgttttagg	gtt
ggaaaaggga	agtgaagtta	tgttgagaga	cgt
gagggtttag	ggtatttggg	agtcggtagg	a t a

ttcggggtgg gggtagttat	ttattaggag tgagg	agtcg gcgcgaggag tggaggaggg	15780
aaggatggtg	gtagttgg	gg agttagcgtt	agt
tatgtagagt	tgggtaaa	tt tttattatta	ttt
ttattattgg	aggtttag	gt tgtttttgtg	gtg
tttttttt	cggggagg	gt ttgattggtt	t t t
cggtatcggt	cgtatagg	ta ttattattgt	tat
taagggtgag	gggtattt	gg gggtttgggg	gtg 10
ttatgtttgg	atttgagg	tt tgattgtttt	tta
ttagaagatt	atttagat	gg tgcgggcgta	gcg
gtataagttt	atttacgt	gg ttatcgttta	gtt
ggttttgtag	gtgcgtgt	ag agtagggttt	ggg
gtgttatttg	gttttgtt	gg gattattatt	t t t
aagggttagg	agtcggag	ta cgggaatatt	att
gttaaggttt	ttcgtatt	tc gtttaagtga	gtg 20
tttttttgtt	ttgtttag	tt cgattttat	ttt
gggatttggt	tttaagtt	ta ggtttggttt	tta
gtgtttatac	gtgtgggt	tt ttgttaggta	tta
ttttgtttt	taggagtt	tg gagtttagtg	tag
ggggtggtta	gaggggat	tg ttagtgtcgg	gtt
aattgtttgt	atttgttt	tt ttgtattcgg	ttg
tttgtatatt	aagaataa	ga gggaggagaa	agt 30
gaagagtaag	ggtttttt	ta agaggaagtg	agc
agttttttg	tttgggtg	tt tttttgttt	tgt
ttgggtggat	ggggtggt	cg tagttttatt	ttg
gttttattt	taggtttt	ag ttatttttt	att
agttttgatt	ttgtggaa	gt atttcgcgat	gga
ttttatttt	ttgtaatt	ta aatggttgta	t t t
agtttagtta	ggttttag	gt agggttaatt	t t t 40
tattgtgtgt	cgtttttg	ag ttttttgttt	gtt

taggatgggt aattgtgtgt	gttttcgtgc gtgtttcgcg	tgaaagtttc gtttttcgtt 17520
agacggacgt	gggtcgggat	ttcgtttcgt acg
ttagttttt	ttttaaaat	ggagggcgat tat
atgacggttg	acgataagac	gggtatagtg att
attaaaagat	tatatacgtt	agtttagttt agg
gcggaaattg	agggatagaa	aaattaagta att
atggaatagt	gaggttggga	ttcgaattta ggt
attttggagt	tgtagttggg	gttatttta ggg
gagttttaga	tttgaattaa	gaagagtagt taa
ttcggttgcg	tttttttgg	cgggaatagg gat
tagtttttt	ttttatttag	gtcgttgttg ttt
ttggttgacg	tgaagagtgt	tttgtttttt gtt
ggggttttt	ttttatttga	aatattggtg ttt
ttttaggaag	tgttggcgtt	tatttttgga aag
agaggttggg	cgtgtattat	ttagtaaatt ttt
atagtttttc	gattttttgg	aatttaggag gtt

```
<210>6
<211>
       18404
\langle 212 \rangle DNA
<213> Homo
             sapiens
< 2 2 0 >
<223> bisulfited genomic DNA
                                                 10
<400>6
tttttttgat
             tagttttta
                          agttttagga
                                       ggt
gggggttttg
             taaggatttg
                          ttgagtaatg
                                       tac
gtigtittag tittittagg agtgggcgtt agtattittt gagggatgat tittatcggt 180
tttattttt
             aggatattag
                          tgttttaaaf
                                       aaa
aaggaagagg
             ggataaaaaa
                          taaagtattt
                                       ttt
                                                 20
taagaggata
             agggtagtag
                          cggtttggat
                                       gag
ttgaggagtt
             tgtttttgtt
                          ttcgttagag
                                       ggg
gttttcggtt
             gttaattatt
                          ttttttagtt
                                       tag
gattagggtt
             tttttgaggg
                          tggttttagt
                                       tgt
             agtttgggtt
ggggttagat
                          cgaattttag
                                       ttt
gtaagtgatt
             aagttatta
                          gtttttttgt
                                       ttt
tgatagaagt
             gtttagattg
                          aattaacgtg
                                       tgt
                                                 30
agcgtgtgat
             gagttattgt
                          gttcgtttta
                                       tcg
attattttgt
             tatgatcgtt
                          ttttattta
                                       aag
ttatttttt
                          cggagtttcg
                                       att
             acgtgcgagg
tttacgcgag
             gtacgtacgg
                          aggtatatat
                                       agt
tttatttatt
             gggtaagtaa
                          agggtttaga
                                       ggc
tataagagga
             gaagggttgg
                          ttttgtttgg
                                       ggt
```

gggatgtagt

gtttatcgcg

tatttaaatt

aaatgttttt

ata

ata

40

agaggtgggg

ttgtgagttt

gggagtgagg	gagtgagagg	gtagttggaa	t t t
gttgggaagt	atagaatgag	gttgcggtta	t t t
aaggatatag	ggtagggtag	ggaggatatt	tag
aggatagtat	cgtttattt	tttttgaggg	aat
gttgttttt	tatttttt	tttttttgt	ttt
ttttgtgttt	gtagtcgggt	gtaggggggt	aag
tagtataggg	ggattcggta	ttggtagttt	t t t
agttacggtt	tttgtattag	attttaagtt	ttt
gagtgcgttg	ttggtattta	gtagaggttt	ata
aatagaaggg	gtgagaatta	agtttgaatt	tga
gttttttta	gaaagtgagg	atcgggttgg	gta
gtagttaggg ttatttattt	t ggacgaggtg cgggaggttt	t tggtatgggt attittatg	1920
gttgggggat	aggtgatgtt	ttcgtatttc	gat
agggatagtg	ggaaggtggt	ggttttagta	ggg 20
tttttttt	ttttaggttt	tgttttgtac	gta
tggttttaat	gaattgggcg	atggttacgt	aga
ttatgttcga	gcgttgcgtt	cgtattattt	gga
ttaggtttgg	gtgggggta	gttaaatttt	agg
tgtttattt	ttattttaa	atttttaggt	gtt
tgagtatgtc	gatgataatg	atggtgtttg	tgc
ggggtgttat	tagaggttag	ttaagttttt	t t c
ttagttttag	gtattatagg	agtagtttga	gtt
ggttatcggg	taagtgatga	tggaggtttg	t t t
ggttttgcgg	tgttgacgtt	ggttttttag	ttg
gcgtcgattt	tttatttta	gtgagtggtt	gtt
aattttatta	ttgttttgtc	ggtttttagg	tat
ggagttatgg	agcgttttt	agtatggttt	tat
agggaaagga	tagttttgag	atagtagggt	g c g
agtagtgtag	taggaagttt	tttttttt	tta

ttttaggttt atttttagtt gagtttagta agt ataattttt ttaaatttag attgttaaaa ata aaaggttatg gggtttttaa gaagtgtgtg aat agttttcggg gatgggtttg tttttgagag agt tttatcgggg gtatttttag atttagtcga ttt aggtcgtcgt agg ggggaagagg aggaagttag aaggtaggtt tttattttt tat ggatcggggt 10 agtaatagcg tttagttttt gagggttgac gga tgagttttta cgataatttt gagattttga ttt aagttaagta atttgtttaa gattatatag ttg ttttttattt atttaggtta ggttagttta gtg tttgtagttt ttatttttgt attttattag aggttttttg attataaata tgcgggtaga 3660 tagatagagg agttatgtgt agttttaaag aag tggggaagtt ggttaggatg gggtattgtt ggg 20 aagttttgcg gttatcgatg gaaaaagagg agg agaaattaat ttc ttttgggaga agaatgggat ggtttattgt gggtgtttgt tcggttttgt ttt ggtttcgggt ttttttttg tatttggtag ggt gatatttata ggtagagggt ttttgaggaa taa tttagggttt tggagttatg aggggattta gga ttaacgttta tattgtttat aat aatgtgcgag 30 tta ttttagttgt tattattatt attaggatta ttttgcgtga ggtagatttt tttgtcgttg gtt tttaggttta ttggggattt tatggtcggg tta tcgaattagg ttttttaag tcgaggatat agg ttttatttat tttatttat tcgattagag agg ggcgtggggg ttatttatat tgt aatggggtag gtttgtattc ggttgtgtta tgtttttcgt agt

tagtatggga

tatttcgggt

gttgtatgtt

40

cgt

tatagagtag ggtattgtgg ttt ggggatgagg cggtttaaat atttgttgga tgg tgtttggtat ttaattatta ata atttgggttt tcgttttaga tcggtatatt cgtttgttat ttaataaacg ttg tgtaaattat atagttttat agatataaat aat tat gagtttatag agataggtga tcgggggaga cgtaattttt tttttaggtt ttggaggaaa taa 10 cgaggtattt gtt ttcggttgtg tttttaaaaa tttttagtag aaaatgagtt tgtgtaaaga aag gcg ttgggggcgg tgagttttta agagaagcgt ttagagtgcg attttattt aaa atgttaggtt tagaaaggaa ggaatttgat ttagtttgtg ttacggatgg gattatttta atggtagtat 5400 agagggtgtt gtgtaggggg agtttgtagg gta gat ggtagggagg tttggatgta ataggagggg 20 tggagtttag gatagtttgg aatttgggtt aag tta gtgtagtcga gattttgtta gggttacgtt ttttgttttg gta tttttattt tgagatttt gattataagt acgggggcgg atgcggggaa ggg tgatacggtt gtt ttttcgggtg gttatgacga aattttggtt attgatcgtg gtttttagat ggc gtttagtagt tggttttgga cgtaagcgtg gag 30 ttt attattgtta tggtttagta taggttttga tttagggttt ttt tttgtttagt tgtttttgga gtttttttt ttacgtggtt tatattgttg att tcgtttttgt gattcgggga tgttattgtt agg gggcggagag gaggcgagat ggtttgggtt agt ttttggtttt ttttttgagt taataggtta aga gtagtagggg tgggggatta tttgtatgga ggg aatttgtttg ttggtggtgg gga agtagggggt

gggaggtttt gtgggggtg tgg ttggagaagg ggaggtagtt tggagatttg tgagatgagg ggg ttt gtagtttggg tgtttatagg ggagaatgtt ttt tttagacgtt ggtgtaagtt tcgttgtttt ttagttttta aag tgtgggtggg gaaatgagta gggtgggtta ggagtagagg tgggtaagga ggg ttttagttgt tttagttttg tcg gttgttatta 10 tattttcgga ttt gttttggttg ttagaagtta ttattttcgt gtttttaatg ttagtcgtat ggt ttttagaagt t t a aatttagaga agaagttagt tgggtttatt tttgatttgt cgt gggaggtagt ttaatttteg tittittgaa atgitttatt aggitegiga ggitgiegaa ggittitaaa 7140 tgtagcgttt ttatttattg attttggggg gag agttttgaat tta gtttttttt ttgggttttt 20 agttttagta atattgtggt tatagatagg gag ggtgattttg agc ttttgatgtg tcgtatatga gaagttttta ggt ttattgagta tagaaagtac gtttagggtt cgtttttggt ttgtagtagt gtt tagagaaggt agcgttaggg aag tggtattatt atatttatag agaggggtcg gaa ttgagtagag ttattattt att gtttttaaat tgcgttatat 30 attatttta ttttatagat gag taggtatgat ttttagggta agt ggtttagggt ttttgattga gtgtagtggc gcggttatag ttttttgtag ttt tttttagagt tttcgaattt aga tttaatcggg tta gtaatattta aaatatttgg aggagagaag aggtaaagag aaa tgtgttttag tagagattag gatttaagtt ata tggtgggaga tggatatata 40 ggaagataat tttattgggg aaa agggaggcgg

ttggatgatg ttattgaagg ggagtttagg gtt tagaaagtag aattaagttt ttttttcgaa gta ttttataaag tttagtttta taggaaatta cgt ttt gggagagagt gagaagtgag gttgtgaggt gtaaattttt taatcgtagg gatggggga agg ttttatttt gttcggaggt gattttagtc gag gggttatttt agtttatcgt ttggggatag gtt 10 gagttttttt ttttaggttt taggatgagg aag gagttatcga taa aggaagcgta gggatagatg taaggtagag gatatagtag aatttgggag aaa gggtgatatt ggtttttggg acgggttatt taa atttaggttt tagtttttt tgtaggggtt ttt ttagttcgtt tttttttt ggt taggtattgg 20 agttttagag ggtttcggtg ttaaaagttt ttt atacggagtt agttatgtga ggt tagggggtag gttttttagg aggtcgattt tgg aggaaaggag tgttttgatt tagttttaag ttttaattag aaa ttttagagag gttgtaagtt ggtaggagta agg aagggtaagt tgaatgtagg gatttacggt cgg atttcgttgt tttttattt aag ttttagcgtt 30 gaggagtatt tag gaaaggagtt atggtgttat ggggaggtta tag gggagattat aggaggagtc tgttcgggat agcgtgagat attttatata ggt tttttgtttg ggtcggagat ttatttgatt tta ttttggtaag tat ttgggataag gtattaagtg ttttttattg ttttaatatg tgttggggtg agg ttagaggaag aagagttttt taataataga gtt

tgggatttgg

ttgtttttag

agtggttttt

40

gtt

cgaggt	agt	t	t t	t	t g	z t	g	g	t	t	t	t	t	t	С	g	g	g	g	t	t	a	g	
agatat	tag	g	t t	t	t a	ıg	g	а	t	a	g	t	a	g	g	g	a	g	g	a	g	g	g	
agggga	ggg	g	a t	g	g	ıg	g	g	t	a	g	g	t	a	g	t	g	t	t	g	g	t	t	
tagggt	ggg	a	g t	С	g (z t	t	t	a	t	t	t	t	t	g	t	t	t	g	g	g	a	a	
tattag	tgg	g	a t	С	g	3 a	g	t	a	g	t	t	t	a	g	С	g	g	g	t	a	t	t	
tttgta	gga	t	a t	t	t t	t g	t	t	g	t	t	g	a	g	t	g	t	a	g	t	a	t	t	
t t t t t t	t t t	: t	a t	a	t a	a g	g	t	t	a	t	a	g	a	a	a	t	t	t	t	t	t	g	10
gatttt	t t a	ιt	t t	t	g	t a	g	g	g	t	a	t	t	а	g	g	С	g	g	t	g	a	g	
agggta	ggg	; a	t c	g	g ·	t t	g	a	g	g	t	t	t	t	g	g	g	t	g	g	g	g	g	
agggat	ggg	g	a g	t	g ·	t g	g	g	g	g	t	t	g	g	g	g	g	t	a	a	g	g	g	
gggaat	tag	g	a a	t	g	a g	t	g	g	t	t	t	a	g	g	g	t	t	t	g	g	a	t	
gggttgcggg g	ggttt	attt	atti	ga	cgg	a g	ag	cg	ag	aag	t t	at	t t	tg	gt	t	t t	tg	cg	att	10	62	0	
gggttg	agt	: t	a g	g	a	a g	t	t	a	t	С	g	t	g	g	a	t	a	t	t	t	С	g	
tttatt	gag	g	t t	t	C (3 g	t	g	a	a	a	t	t	а	t	t	t	g	g	g	С	g	g	20
cgtggg	tat	t	a g	g	t	a t	t	t	t	t	g	t	t	t	t	t	t	g	t	t	t	a	t	
ttttgg	ggg	ţ t	t t	t	C (g g	a	g	a	g	g	a	a	g	g	g	g	g	С	g	t	a	g	
taggta	gag	g a	g t	t	t	a g	g	g	a	t	t	a	a	g	t	t	t	t	a	g	a	t	g	
attttc	ggi	g	g t	t	t	t a	g	t	t	t	t	g	g	g	g	t	t	g	t	t	a	t	t	
ggggat	agg	g a	a g	a	g	g c	g	С	g	g	t	С	g	a	t	t	t	t	t	t	g	g	g	
agtata	gta	a a	g g	g	a	a g	a	g	a	a	g	t	а	g	a	g	t	a	g	g	g	t	g	
ttttat	ace	g t	t t	g	t	a a	t	t	a	a	a	g	g	t	t	t	a	g	g	a	g	t	a	30
gtagta	agg	g a	t a	t	a	t g	t	g	t	g	t	t	t	t	g	t	a	t	a	t	t	t	t	
aattta	ga	g	g t	t	t	t a	C	g	g	t	a	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	
ttggtt	tad	g	t t	a	а	t a	a	t	a	a	t	g	a	t	g	g	С	g	g	t	g	a	t	
tgtcgg	gce	z t	t g	: t	g	t t	a	t	a	a	t	g	g	С	g	t	t	t	a	t	a	t	g	
ttttat	gaa	a a	t a	g	g	g g	t	t	a	t	t	t	t	t	a	t	t	a	t	t	t	t	a	
tttaag	gta	a t	t g	; t	t	t g	a	g	t	t	t	a	t	t	a	g	t	g	a	g	t	t	a	
tagttc	gg	t t	t t	a	a	a g	; t	t	а	g	t	g	t	t	t	t	g	a	a	t	t	t	t	40
aataga	ga	t t	a a	g	a	g t	t	t	t	t	t	t	g	t	t	t	a	a	a	g	g	g	g	70

taagattttg	ttaatottto	taagagagaa	ggg
		•	
	tattgtggta	gaggatgga	taa
gggtttttt	taatttttgt	ttttaggttt	ttg
tttattttt	gggggttggg	ggataaggtt	t t t
tgattttaga	ggttttaaat	attaaggtat	atg
aaatattaat	atcgttaaat	taaaacgagg	aaa
atatatattg	gtggttttt	ttagggaggg	a a a 10
gagatatttg	gttttttata	tattttttg	aat
ataaaaataa	atatgttaat	tgggaataat	t t t
ttttttgttt	ttatttggat	gttgtttgta	tgg
cgtagtggtt	tacgtttgta	attttagtat	t t t
gttaggagat cgagattatt	ttggttaata tggtgaaatt	ttttttttat taaaaatata	12360
aaaaattag	ttgggtatgg	tggtgggcgt	ttg
taggagaatt	atttgaattt	aggaagtcga	ggt
attttagttt	ggtaatatag	taagatttta	ttt
ttgtgtgttt	aatatttatg	aatattatgt	atg
ttttaagttt	aataagttta	attttttat	gat
aaatattaat	gtttttttt	aaaaaaggtt	ttt
atttgtttt	ggttttttt	ttttattggt	gtt
gtatggttta	gttttgatta	ttttttagt	ttg
gcggaatttt	tacgtttaac	gttaaggagt	aag
gcgggatatt	cgttggcgtt	ttcgtttatt	tcg 30
ggtattgagt	aagtgtttaa	taaataagtt	cgt
agtatagttt	tttggtttta	tatatatagt	ttg
tatagttata	gtatatatat	tttattattt	atg
gtatattttt	acgtatggaa	tataaatttg	a t t
gtattaaacg	tttattgtat	tttggtttta	aga
ggtgggaagg	aattaattcg	gtatttagaa	gaa
tggaagaggt	aggaatttt	ttgaagggtg	t t a

gtatagtttt tgttatttt tggtaggaaa ata gtgtggggtt tgtagattat ttttatatat acg ttatttttt attattttt atg tgatgtagga gtaaatgttt gataatttag aattataaga aag ttaggcgtag gagattaagg tgg gataaaagta atttgatatt gggggtgagg ttggtggatt aag aaattttgtt tttataaaaa atataaaatt tag 10 tgggagattg agatgggagg atc tttaggtatt ttgtaattcg gtt agtgagttat ggttgtgtta tta atatagttgg gcgtagtgat aaaaataaaa gtt tcgaggtggg aggattattt gaggttagga ttttattttt attagttigt aattitagti tittaggagg iggaggiigt agigagicga 14100 gattatgtta tcgtattta gtttgggtaa tag tatatagatt aagattaatg gtg aattaaaaat 20 taaaataatt tgtagaaagt ttt gtaaataagg tgagtttaat aatattttt aaa gtttgataaa ttttatatta tat tgttgttagt agggttttag gtaggtgtta tttatttaat tttagaaata gaa gtttaaggtt ataagttagt gagtaggaag gtg gtttggtgtt ataattatat tgt tttttttta tatagtttat gatggaaggt gga tgggtattgt 30 gtacgtatag agt taaagaggtg tgggttaggg agttgttttg aagttatgtg gttggagtaa aga ttaaggttag gttgagaaat taaggatgaa att agacgggatt agg tttggtagga aaatgattat agatgtgtat tgg cggtggggtc gatagtgata ttt tagggttagg gagttattta taagaattag ttt gttgttattt tttttttt tttttttt 40 tta taggttggag tgtagtgacg taatttcggt

t	a	a	t	t	t	t	t	t	t	g	t	t	t	t	a	g	t	t	t	t	t	t	t	a	g	t	a	g	t	t	g	g	
g	t	t	t	a	a	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	g	t	a	t	t	t	t	t	a	g	t	t	g	a	g	a	t	
t	t	t	t	g	a	a	t	t	t	t	t	g	a	t	t	t	С	g	t	g	a	t	t	t	a	t	t	t	g	t	t	t	
g	t	t	t	g	a	g	t	t	a	t	t	a	t	g	t	t	t	a	g	t	С	g	g	t	t	g	t	t	a	t	t	t	
t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	c	g	a	t	t	
t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	
t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	10
t	t	t	t	t	t	t	g	a	t	a	t	a	g	a	a	t	t	t	t	g	t	t	t	t	a	t	t	a	t	t	t	a	
t	t	a	t	t	g	t	a	g	С	g	t	С	g	a	t	t	t	t	t	t	t	g	g	t	t	t	a	g	g	t	g	a	
t	g	a	g	a	t	t	a	t	а	g	g	t	g	t	a	t	g	t	t	a	t	t	a	t	a	t	t	t	a	g	t	t	
t	c	g	t	a	g	t	a	g	a	g	a	t	g	a	g	g	t	t	t	t	t	t	t	t	t	a	t	g	t	t	g	t	
aa	gti	ga	t t	t t	t	t t	at	tt	tag	tt	t t	t t	aa	at	t	gt	ta	gg	att	at	ta	ta	tg	t t	t	gg	gt	ta	tta	15	84	0	
t	a	t	t	t	a	g	t	a	t	t	t	t	t	t	t	t	t	a	a	t	a	g	a	g	a	t	g	g	g	g	t	t	
a	t	t	t	t	t	g	a	g	t	t	t	a	a	g	t	a	a	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	С	g	g	t	20
g	С	g	t	t	a	t	t	t	\mathbf{t} .	a	t	t	t	c	g	t	t	a	g	g	t	t	t	t	t	a	t	t	t	t	t	a	
t	g	t	t	g	t	g	g	t	t	t	t	g	t	t	t	t	С	g	t	t	t	t	a	t	t	a	g	g	g	t	t	t	
t	g	t	t	t	g	t	t	t	t	t	a	t	a	t	t	a	g	g	g	t	t	t	t	g	t	g	t	t	t	a	t	t	
t	t	t	g	a	t	t	a	t	t	a	C	g	t	t	a	t	a	t	g	g	t	t	a	g	t	t	t	t	t	t	t	t	
g	t	t	a	t	t	t	t	t	t	С	g	g	g	a	a	g	g	t	t	t	t	t	t	t	g	a	t	t	t	t	t	t	
g	t	t	a	t	t	t	g	t	t	а	g	t	a	t	a	t	g	a	a	g	t	t	g	g	t	t	t	a	t	t	t	t	
g	t	t	t	t	a	t	t	t	t	g	t	C	g	t	t	t	a	g	g	t	t	g	g	t	g	t	g	t	a	g	t	g	30
a	t	t	t	t	t	t	a	g	g	t	t	t	а	a	g	t	a	a	g	t	t	t	t	t	t	a	t	t	t	t	a	g	
t	g	t	g	t	t	a	t	t	a	t	a	t	t	t	a	g	t	t	a	a	t	t	t	t	t	t	a	t	t	t	t	t	
t	t	a	g	g	t	t	g	g	t	t	t	t	a	a	a	t	t	t	t	t	g	g	g	t	t	t	a	a	g	t	a	a	
t	g	g	g	a	t	t	a	t	a	g	g	t	g	t	g	a	a	t	t	a	t	t	a	t	a	t	t	С	g	g	t	t	
t	t	t	g	a	g	a	a	t	t	t	g	t	a	a	t	g	a	t	t	t	a	a	t	t	t	a	t	t	g	g	g	t	
g	g	a	a	t	g	t	a	a	g	t	t	t	C	g	t	g	a	g	a	g	t	а	g	a	g	a	t	t	a	t	g	t	
t	a	t	t	t	t	а	a	a	t	a	g	t	a	t	t	t	g	g	t	g	t	a	t	а	а	t	a	g	a	t	g	t	40
g	t	a	g	g	g	g	a	a	a	g	g	g	a	a	g	t	g	a	a	a	g	g	a	. a	a	t	a	a	a	g	a	a	

ttt gtgcggagaa gttggttgga cgtgggaggg gtt tgaggtgttg tgagttattt agggggatag agtagaaatg taatggagag aat agaggttgga tatgagtgag tcg ttaaagaggg ggtagaggag aagtttatag ggatcggaaa taggcgtagg gta ttt agtattaata aagttttttt cgtcggagtg tttacgggat agt tcgatggtgt tcgggattta ggcggagggt cgtaggggc ggggttgagt tag aagaatcgtt tagtaattag tta ttaggtgagg attttggatt aat taatggtatt gtagggataa ggggttggtt cgagatcgtt tatagcggtt agt agtaggttcg tttgttggtt tagggtcgtt ttttttcggg agaggaggag ttatttggag 17580 ttttatttgg agtttaagtt gatagagcgg cgg agtaattttg gttgaggaag agtaattaat ggg gaaaattttt aatagtttag ttt agggtttaag ggtttattta tttagggcgt tgagggattt att ggggaggagt tttaggtagg gttaggtttt ggg atggggtttg gggaggagtt gtttaggggg gaa taggttcgta agagattgat att tgggggttgt ttgtttggaa tattaaggtt tttttttt tgg tacgttgtta ttagtagtag gtt aggaggcggt tttgataggt tgg gaaatagcgt ttttagtttg ttaaggatat ttg atttgattaa gcgagtaaat tagcgtgttt aagatatttg ttttaaggat gag gtttgttaaa tttttattgg ttgggtagtt tag tgatatttgg tttatattgg gta gtttggatga

20

10

```
<210>7
```

<211>19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

10

<400> 7

caggccagtg gagtggcag

```
(210) 8
```

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

< 220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

10

<400>8

gaggaggtgc agctagtctg

<210>9

<211> 126

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400>9

cagging cagting cage congains grant acting grant category control of the category category can be caused as a constant of the cagging can be caused as a care can be caused as a care can be caused as a care can be caused as a case of the case of t

30

20

 $\langle 2 1 0 \rangle 1 0$

<211>21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

(220)

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

<400>10

caaagcactg gctttggaac c

10

<210>11

<211>21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

<400>11

atcgagtgag tcctgctgga t

30

<210>12

 $\langle 211 \rangle 227$

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400>12

caaagcactg getttggaac eggaetgtet gggactgaaaat 120

10

20

30

gataaagata gcccctgttt catagggctg tgg aacgccatta tagcacagcg cccggcatcc agc

<210>13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

<400>13

tgtctggagg ccacggtcaa tga

<210>14

<211>25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

<400>14

gtttgtattc ggttgtgtca tgctc

```
(210) 15
```

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

10

<400>15

cccagttcat tgaaaccact

<210>16

<211>20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

30

20

<400>16

ccttgctctt ctccttgtct

<210>17

(211) 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

< 220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

<400>17

gaacgttatt atagtatagc gttc

10

 $\langle 210 \rangle 18$

 $\langle 211 \rangle 21$

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequ Synthesized Primer Sequence

<400>18

tcacgcatac gaacccaaac g

30

<210>19

 $\langle 211 \rangle 159$

 $\langle 212 \rangle$ DNA

<213> Homo sapiens

40

< 4 0 0 > 1 9

gaacgccatt atagcacagc gcccggcatc cag cgccatcatt gttattagcg tgggccaggg agg ggagagatgc cgtgggaccg tctgggttcg cat

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1遺伝子ゲノムDNAのセンス鎖の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図2】図1に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図3】図1・図2に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖の塩基配列の 続きを示す配列図である。

【図4】図1~図3に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 5 】図 1 ~図 4 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 6 】 図 1 ~ 図 5 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図7】図1~図6に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖の塩基配列の 続きを示す配列図である。

【図8】図1~図7に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖の塩基配列の 続きを示す配列図である。

【図9】図1~図8に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖の塩基配列の 続きを示す配列図である。

【図10】図1~図9に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図11】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図12】図11に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図13】図11・図12に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図14】図11~図13に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図15】図11~図14に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図16】図11~図15に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図17】図11~図16に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図18】図11~図17に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図19】図11~図18に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図20】図11~図19に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図21】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1遺伝子のcDNAの塩基配列を示す塩基配列図である。

【図22】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1蛋白質の概略構造を示す模式図である。

【図23】図22に示すSHP1蛋白質のアミノ酸配列を示すアミノ酸配列図である。

【図24】図1に示すSHP1遺伝子のゲノムDNA(センス鎖)において、CpG島でメチル化されるCG配列の部位を示す塩基配列図である。

【図 2 5 】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる重亜硫酸処理にて、シトシンがウラシルに変換される過程を示す化学反応説明図である。

【図26】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる重亜硫酸処理により、シトシンがウラシルへ変換され、メチル化されたシトシンが変換されない状態を示す模式図である。

20

30

10

50

10

20

【図27】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1遺伝子ゲノムDNAのセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図28】図27に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 2 9 】図 2 7 ・ 2 8 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図30】図27~図29に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図31】図27~図30に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図32】図27~図31に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図33】図27~図32に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図34】図27~図33に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図35】図27~図34に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図36】図27~図35に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図37】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1遺伝子ゲノムDNAのアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図38】図37に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図39】図37・図38に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図40】図37~図39に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図41】図37~図40に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖 30に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図42】図37~図41に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図43】図37~図42に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図44】図37~図43に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図45】図37~図44に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図46】図37~図45に示すSHP1遺伝子のゲノムDNAにおけるアンチセンス鎖 40に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図47】(a)~(d)は、それぞれ本発明で用いられるメチル化特異的PCRのステップを示す模式図である。

【図48】(a)・(b)は、本発明の実施の一例である実施例1において用いられるPCR用プライマーを示す塩基配列図であり、(c)は、(a)・(b)で用いられるPCR用プライマーが認識するSHP1遺伝子(ゲノムDNA・センス鎖)の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図49】(a)・(b)は、本発明の実施の一例である実施例2において用いられるPCR用プライマーを示す塩基配列図であり、(c)は、(a)・(b)で用いられるPCR用プライマーが認識するSHP1遺伝子(ゲノムDNA・センス鎖)の塩基配列を示す

塩基配列図である。

【図 5 0】 (a)・(b) は、本発明の実施の一例である実施例 3 において用いられる RT-PCR用プライマーを示す塩基配列図である。

【図51】(a)・(b)は、本発明の実施の一例である実施例4において用いられるreal time RT-PCR用プライマーを示す塩基配列図である。

【図52】(a)・(b)は、本発明の実施の一例である実施例5において用いられるメチル化特異的PCR用プライマーを示す塩基配列図であり、(c)は、(a)・(b)で用いられるメチル化特異的PCR用プライマーが認識するSHP1遺伝子(ゲノムDNA・センス鎖)の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図53】(a)は、蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH)を示す 12 図であり、(b)は、ALL患者におけるSHP1遺伝子の異型接合性喪失の解析結果の一つの典型的なデータを示す図である。

【図1】

contotagit gigocoegig teguconant gionicatos unaccacacg gracagaggò otgoatgost cotstitues assossotus coagcounts suggascent testgottas actsocacco octocarate tottagroso gotestoott argagagge tigacottoo sotcoctott geagatgtee ttaagtttge tegettggte asgtootsog sagoocaggs tootgagate goongootst cargonaget ganggogots titotgooge costsacoot gooscoccat aggeotycty otgytygoag cytygocyce teotyagayt tygoodtocc ttgtgccapt gcceggggg gasaggcott gatgttccag scantastas atgcgootgt santtagnet teststesst etettspass cotsanage constitute ettocotsst tecetotgee titecaggee contococot ganeagotee tocotatggt cotggetggg cotsaccets occossisce tascectace tenggeteet eccettooco oggazoagat tgagaggotg gagtgggtoc otcagogoco tgggtgggtg ggootgosoa gggggtacot. cottototge gguactgego tgttaggget tttoottagg cootttggtt tccgcctscg gagaggtito occontiggt igototicot cagooagegt teoticoteg toigticoco tenconstan congruente tetraguite agutocaset geagatocas etescicato ototocoggy ggnaggoggo cotggaccag caggogggos tgctgtacto cogotitiggg gotgongaga agotggoogo tgtgggoggt otogggoong coccgoocca cotgtocttt tootggagac tattagtoca gggtttgtoc otgcagtgcc ATTGGCCTDG CASSCASGAT COASGASSAA STORCTSATT ACTSACCSOT TCTTCCTCAC CTSGCTTGGS CCACTETGCA CARCTRIFICO BOTGGOTCAB COCCOCCCC TECGGCCCTC COCCUTEGCT TCCCCCTCCC TACAGAGAGA TGOTETOCOS TGOgteseto cogregososa toggestoco astotoctat tagttttega gggaggagg gottigttga tgotosotoo gaogtgigig asogtgagig ogstotgoog otgocotgog cotgittoog glocotetge sottoccott coogceaggt gigaggacoo coggotomot catgotocto igococcitoi timecatiti cocciggaca agigigiato igitototoo atigostito isoticosgo ototgegoto etgottetgo otcotgotta ggacotgtos ocotgggtag otcacascas otcasacata gcagtcagag spendence assengator caustocase pasettotos scauttocoa acatoasset ttagtoccat éttettigit tootticact tesetticce etgeateatt catteaseag gtecetette agostotett atgosoosge tgotettias gatgotegta atactegagt ganodagnos gaostegtot otgototoso ggagottaos ttoosgtegg sgettacagu coguacanet asconnetas attegatost tecagattot caganetatt soccagasas tagacagoot tagacagata tagtastica cacctataat cocagosota tagagagata aggogagage attgottgag cocaggaget tgagacongo otggocasta tagtgagac otgiototac assassinag esattagotg guigigging cacacgioot giggitocag

【図2】

120

300

360

420

600

660

720

840

900

860

1020

1080

1140

1200

1280

1320

1380

1440

1500

1680

1740

1800

1980

2040 ctategagag gotanggiga gaggottgot tgagootgeg aggtcanggo tgcagtoago 2100 gatgattens ocentenens onegottes ogenegagte aganotisto tossassassa densesses geneatizado cagottosta tgotagosag tgaotgggtg tgoaggtgao attactagot ggngggatca gggaggoott occgaggagg tgacattiga gotgagacco 2220 ggatgaggag gaagaggago tggcoatgtg acgtsgtgat casgagtess gestotetgg 2280 gengagaga testpagene asseccetas tetegenaca encuasanes eracastate 2340 occategose agracocotas tesascoreas scarescoso agcarettas accatettas 2460 agotagests tigeaastra assoctrace agetgeretg sogosogtot etgatoccas cactitegga egocgaagge gyaagattgo tigagotcag gagittaana ocujoctegg cancatagag agacoccato totattanes sassatsotg gatatgateg cocangostg 2580 2840 tustestoot agoagtites suggetsage tussassute actigagooc assusticas ESCUSCOCIA ESCUSCATAS ESESSECCI DETOTOTACE ECESCIACES OTACTATED 2700 tectestass tagotggatg tagtggoatg oscotgtggt otcagttact tggasagetg aggonguage atoacctgag occasgonget ogsogotgca gtgagitaga tigigacant 2820 goacttoago otgggtgata angoangatt otgtgtoann asannaanna asangagaga 2880 2940 RESCRIPTION OFFICERS MANUSCOMES OFFICERS AND PROPERTY OF THE P CLUXECUTOR LEGISCOURT LEGISCOURTS OFFICERS SECRETORY LEGISCOUR CONTRACTOR nagtgaceco cagtoguese sagasseges agessasges saugtgaces coggtogues 3080 gannangan mangtgacan coggetgage atgatggeto aspectgtas teccaguact 3120 tiggaggoo gaggoaggig gatosogagy toaggagtto asgaccagoo tggcosacat 3180 entrasecco tetotosact assentacas assessantt argotescao agtestgogo acctgtgagt occapetact agggaggetg aggcaggaga attgettgaa cocaggagge 3360 ggaggtigon gigagoogag attgogioso igosotooag ootgagigon gogggagaga otocatotos assassama esassgasas gassasgtga cascotgott acagagtaot 3420 geographite temptagets gotocotago congotgate ottgottoto acastosigt 3480 otroccotro occartecao atottetoro tetorgocco sociateres ttocteotra gtottotegt occidateco gtotetegic attitcoigo caggiagott ggooaggoot 3660 concetate agatitosto ottestitot cagostagos tignatesco stotacagos gggtococco ototosgano mottigoto osgovacetg gottgotoso ggcoaggeso 3720 3780 igocontata sactotatas atgococoto titigocotas cocatatias ciciasses gesettette otoosootte estestgege tetegesetg occatoocst etgooccess ogotgtotgo tgcagtatgg ttgttggggg qaagggcaco aggotcoggo gtotgacago 2000 ogigitities oceasition estosotego tigigasoti aggosatias tiassatoto 3960

[図3]

tgagtottag tttotgitto teassitigg tgantascae etactasgia sygitegeet 4020 gaggattaat agtataatgt aasagotggo agcactgasa cootgoosot taccagottt ANRO transferst attinguese tettattees ofcettisto exposurest totranscto 4140 agesceptic cognectito tecapatist titigocitat tigogotico agusticota 4200 4260 tottottgtm tosocettgm tottgmtotg tetggttttt estttittt titttgmgeo ggagtttcac totgftgccc aggotggagt goggtggcat gatotoggot cactgonacc 4320 tocacotost gagaagotgg gattacaggo tagtagagat ggggttocac tgtgttgocc 4380 4440 agotgatoto gasotociga cotosagiga tocicocaco toggocicoc asagigoiga gattacaggt gtangtonot gogocoagot gtattittet tttitgagac agggtotono 4500 totgicacco aggreggatt scagtggoad ascostggot captgoagoo togaccacco 4560 caggotosag ogatostoco atotosgtot occasgtaco tggggotaca ggggtgtgct 4520 4880 socsoscoty gotsastttt gistittite tegageorgy gittotcosy gittoctage otgototosa sottegigio sagitantoca coagootoso coccaosase teotegesti 4740 aggogiga goomotgogo otggootiga tototaotit tatottootg ottocaagga 4800 antatttitt tottotgaat tatoaggoat tigototigt antiotiagt otocotsogo 4860 tigiticoro contenzana ategeranasa tenttoctac atcaceguas tetotrares 4920 ctaastgaga togtgtatgt gesagtgate tgossacocc seacoutges asggtsaggg 4980 aggiagitit tistiticat goossaggat agoagsagot giacototig toigagitot 5040 statettego tigacesoot teagaggast tootgoctot toontgggto aggangaggt Ston gootegiteg titottotgg gigoogegit esticottoc esconaging gittengood 5180 tggsaggugt gtottggggo cagggtgcag tgggogtttg gtgotgagoa tggsoctgaa 5220 motiogists testoagatt tateitooat gogtegegat stecaoogga ocassiatet stategates montgestes tempetatet etgoteteno tetateteon coottecote 6340 ogtatgacaa goaggotgtg tetgtaggac caggaagotg tacttgtggo caggtatgtg 5400 gotatggact gangagotts titgttgaan actigctong teccargoat ogonotegan 5480 totgasoact cogagatgag ogagagogoc agogggtgto ocgogotgos goosguttig 6520 catgigotot tottgotoot tggogttggg ogtgggggtt cogoggattt ooggggotot 5580 sessigitat connection session angoing content occasions 5640 5700 menticocco mercaccout regenerates maccareneo menteraca admirenare asgassagtg gassagcott tittgggggs sascattgat gittgatgit totassastg 5780 stantgtagt tetcatgres smattageof tgttgggott mannottitt.ottottiteo 5820 otgasgoage acatgostes tettostess tettesgoso sossootgo tocattitit 6880 5940 ttitttitt gasatagagt ottoctgigt igocaggotg gagtgoagig gigtgatott

[図4]

ggetegetge accetegget tootgggtte augtgattet cetgettean cotocoguati 8000 agotgygett aceggogoco socsocatgo congotaatt tittigisti titugisgag 6060 aggregation acceptation occupants of contotos temporogia atconcomo 6120 6180 ottemotoo casartecte grattacage ogtescomo teogoccero casottomos titatacaca occatgossa cagoatocag atagagacas agagoctico otgiaccota 6240 sengtitoco agenetigit occagitago statitatit tintenuggi setgosigoo 6300 ontoniates onttoness getsigiage genoceagig totococcas contector 6360 6420 carccaccoa gittocotoc ciagrerane concentat gigittotta igiatococt gttgagotgo tittootogi titggtitgg oggigttgat gittgtatit ggnatiaceg 6540 gtaggoagoa tostatacot tagtgtttag ggoctotseg stosacoago cotgaguasi tosgocateg tgaggacott giococcago occcaggaga taggecocct ggtgggaga 6600 otsessons scararcot assescens attendant accontetts acaresotso 6660 tongertont gitgiocato cototeccae agiggostes acaesotecs tatgitggit 6720 agaggagggo accottotot ottgosages tiggosaggt ottasctatt agtotootgo 6780 toccategou goccotting scanggaggo totimatoto tettottine agrocotgagg 6840 gotestetet aggesttoan agcantegot tigganoogg antgiotegg titgastoot 6900 sychologos ofgantesot gategantes sychalgent tasantoent gagentesy 6960 ttoottetot gisanstgat sosgatagoo cutgittoat agggotgigg igagasecos 7020 stragaczag gratgigaso gorattatag caragogoco ggratorago aggartosot 7020 7140 ogstenourt tetoscopco strattetta ttagogtege congeguege otgogtamen 7200 gragotsyty gaggaggas agatgoogtg.gymoogtotg ggitogoatg ogtgaagtat tatotaggoo tagagtatgo saggososos tatatoctta otgostatat tatosostat . 7260 gigosatgoo atgotootga goottigati goagaogigi gggaagiggg coccgiccoo 7320 ecococagig ecacoctgot eigottotet tecetigeig igetetassa egagaagise 7380 7440 sastemento coccasarea terroceco etettoetet poccepoceta consetucco CHEMODARTO BARTECOAGO COCAGAACTE GGACCACOEG EGETERTEAR GCEGCCOGC 7500 ACTROGRÁGOT ECATOTRADO CITAGTOCOT BASCITOTOTO DOTROCOARA OTAGOTECAC 7500 CTOCTCATTC CCT6CCCCC CTTCCTCTCC GGAACCCCC ASGATOGTGA Getaggreco 7620 tgocaccese getagacage aggeragget gootgetgoe cangggacce ofectoactg 7680 ocotgootge googoooge TeatttcAcc GABACCTCAG TEGECTEGAT GCAGAGACCC 7740 TOOTCAAGOG COGAGETETC CACGETAGOT TOOTGECTCG ECCCAGTCGC AAGAACCAGE 7800 QTGACTTCTC GCTCTCCGTO AGgtaggtgg gococcogca accocgggoa ttttggcoac 7860 tototteteo catcoagree otgasecact cattoctest toocostego agtgotesot 7920

[図5]

occupietgi teccettgocc scancecces cactocccat coetgivitgi geocaeccat goccatetet gooocoacco aggacoteag cogatocote coctoctece totactecte CHCCHECTER COLCECCO CHETECOCCE CHEGGTOOOG GATCAGGTGA CCCATATTCG GATCCAGAAC TCAGGGGATT TCTATGACCT GTATGGAGGG GAGAAGTTTG CCACTCTCAC ABABOTBOTO BAGTAOTACA CTCAGCABCA BEGTGTOCTE CABBACCECS ACEGCACCAT CATOCADOTO AASTACCOCC TGAACTECTC CGATCCCACT ASTGAGASET gagggotocg ozcoccogoo attooczago aggatgago oggotoccac cotgazoago cagggaggon symmetry carcogram tentecoot conteccto contecctge accagotesy gototoasty tonotootop otgotytoot gggaootgyt gtotoagago otascotaco socotttoce cotescocog agrasgocac agrasgotgo otogocotec torggesgoc ctrrocects caseccarst cocacterss accrements cactestest accompate tostecargo casciolett sitagasago toticitoci cignatoga gociscotto otoogtotgo ocotosocoo agosoatgit aggacagtga ggagotgaca otggggtgaa guiggigate saturation sagmentity atmostigue coagocycce ogiggggate gatotytoot giggggtons staggtotoo ggooonasca gagatonitg agagonogat stanestatt coccutateta anatetotoa ogotatooog szonossast antactooss goatttoott ootgiggoot ooccasotoo tootgiggto toccasaggo atgggotgga agotgggggo totgaatgot cotcatgaca contegetion titcagongo ogontotcan congutor octtegagta nagggongog gnatemogot agggggtttt cacatgcaco potgagoosa googaottgo cottgoogtg gatocotgos ttostagato agttettgas startowers acottectoo tencescotte casoctotot sassitower octoossect gcatcaatst tittggtoss ggosotgatt gasacttage gutggattog gtosoggtgo agecotating econoctana aggesteeth testamater gesteetten aggestiose totototgtg agcotoscet agotggotoc gtgtotgoco cotgocotto otottococe correspect carrierett therescore executores agotostato etotottetet cottroctco accorrage grarescene ctraccarte cotracerte cassageres grangerocco aggaggocco tgragaggag gutgaggoct gagttesagg agaagagaga statestar kanatatesk koskikocka skokekski, pseksoceta ksekooloso teragecoot titeretyan coginocage agroagigto accontesto oterrastet stausassot otttotocca asttoteote tetoototeo ottetotete osootootoo totgogages titigostotg toootoggig gototgogot tootgiggie agootgecat ttgoategag acttoctoat cotggggcot gagggmagug gutoagococ otcocogota cotgagatoc tagootgtoo conggoggtg ggotgeagta goocartgag attagragge

【図6】

7020

8040

8100

8160

8220

RZRO

8340

8460

8520

8580

8840

8760

8820

R880

9000

9060

9120

9180

9300

9380

9420

9540

9600

9660

0720

9840

0000

totggggto totoggotgg 'agtomoutoo gggonggigt gagatggatt gggacagact getcotocco tooticcoso estocotgog gitggassat itgcccgoco toccotogic 10020 octgractes grasscotes casceteset totosetete tococsassa gagttttets 10080 tittitccat cacgiggitt octgigggo igggotitgi ggggotacag titcotootg greengegt gigottoggg ganagegott agitotgott totgocotga ongoccotto 10200 santacette gascooteer otoccotice gigsostost ocegggosco coagascocc 10280 ctacaposet etticoccag taggettate ttooccagoot ecotagosus suguacoccos 10320 tecgeottee tigigactic agreetates tocatotoco acceptacot significado 10380 otoggtotgo gittototti gostotggio totgotgggg cacagicoca toottoacgg 10440 agattostoo tingottoto tootoomaat attitgasta tigoongoot tiotgootti 10500 caracters ototeratto seasoccest terasotote seasoteses terottenso 10560 otegengato gaggotecas agagotetas occorocact gosotopago otegenosca 10620 gagototgga agottgocot agagtoagto augggooota ggoongtgag tencagoton gogtosytti octostotst essatgyggg testatosta cotegototo egostgittg 10740 tgagagacut aastgaggtg giggatitgg asgostgtag ogoagtgoot ggoacacagt 10800 10860 aggigottes titoogross statetetes etgictotes teagagott cooctetero otgggtotta octtocotga ogotgootto totagGTBGT ACCATGGCCA CATGTCTGGC 10920 GGGCAGGCAG AGACGCTGCT GCAGGCCAAG-GGGSAGCCCT GCACGTTTGT TGTGCGTGAG 10980 ASCUTCASCO ASCUTGGASA CITICATECTT TOTSTRUTCA GTSADGAGGO GAASGUTGGO 11040 COADSCIOCO CSCICAGGGI CACCCACATO AAGSICATGI SCSAGEtang goseponggo 11100 exogeneeus outoteoten egotooteto tetenocaca etsteretes ongeneeus 11160 otgootgego tigasticas ggotgeggac coagggageg agactosagt cotgtgastg 11220 OCCUPANT ABOUT THE PROPERTY OF ACACHORS BECOME ACCOUNTY OF A CACCOTTOCAC 11280 ASCETCAÇOS ACCTENTORA SCATTTORAS AREADOSSEGA TERADRADES CTCAROCUCO 11340 TITETCTACC TECHCARET DEFRURTERE COORECTEOR LOCOCRATTO CONTENENTE 11400 toooccagat gigagottot gggatototg agtigotgac thotogotot tooc 11460 AUCCOTACTA TOCCACRAGO STORATECOS CTERCATTOR BRACCERCITO TTOGRACITOR 11520 ACAABAAGCA GBABTCCGAG GATAGABCCA AGOCTGGCTT CTGGGAGGAG TTTGAGETED 11580 stgategges coggosaggo tggggosgot gaggtggtgg cagcagcotg aggeoccaigs-11640 eggacacett eccetcettg conscetetg etectgacen accomingtg ageteconeg 11700 atggatgoco totttgggag utgatgotoa tttoccosco cacatotoag AGTTTGCAGA 11760 ABCABBADGT GAABÁACTTG CADCAGGGTG TGGAAGGGCA GGBGCCAGAG AACAAGGGCA 11820 ABAACCECTA CAAGAACATT CTCCCCTgtg agosocoagg otgococatt oscocagget 11880

【図7】

and specify occupantly of procedure character transporter acrocages 11040 gerecatoto opogogogo companero topogottot ocemenero totactosto 12000 12000 congregates stoccomoca ocentrates agrituaces testeccamo stockinta actocotose teoctocata caratgates cocascocte etacocacas teccocacas gootoningo tiotragaco aguateroci ritagotone ragretoire cocaretrir 12180 structuret reptarous escostotos cotoctotos rescartoco arTTGACCAG 12240 ACCORAGICA TOCTOCAGOS ACORGACADI AACATOCOCO BUTCODADIA GATGAATGOC 12300 AACTACATCA ACRICARGOAR tringround strengers agrotered oterranto cotstotest suggestacco tagatecase sacasotess carageogea sotssottot 12420 tecaterate aggetrecar testicares cotstactes socassares toactatott 12480 EMBETROSTO TOTOGROSOT TROSTOCRAS ACCASCISCI ASSOCCIBAT SASAACSCIA 12540 ASACCTACAT COCCAGCCAG SOTTOTCTOB AGGCCACOGT CAATGACTTC TOGCAGATEG 12600 CETOBCAGGA GAACAGOCGT GTCATCGTCA TGACCACCCG AGAGGTGGAG AAAGGCCGG 12660 tagggogooc occottoono goatoogooc cogtgottgt getoatgooa ttaagtogaa 12720 gagoagtoag atgcoagggo agasagggat ctoaggggtg agggtooggo cottgttggg 12780 12840 suscitearry ciartescas artotogact acacascris accoccagat occiscatgo stocotysgo tottotysgo tocayacoca gyttocayyo tytootooti cotootacoc otgoccocco tgtotgoato caggoccoto otgtoctoco tgoccoatag atotototgg 12980 setatemen timonatens rentroccost acacagoson otateteste coattesset 13020 gatoccatco gigacecasa oigggicasg ticottcott toigsastot ottocatggo 12080 teotgetoso ottteggets asgtogosot otsaggeotg gesttesagg totgetgeot tecetatgae acquaegott atottgangg atoaccgeco acagongoco angotottto 13200 aggitocoag cotticitig canasgotos tilitotgota agasatgact cictoracas 13260 tatototgoo tegoagatgo otogittitte angacabago oggagogotg octoctotgt 13320 gastocaggi citigiticot coaggacota gaggagast tacgicitto coagocacgo toctoagogo getetotoco coggicacot giototetgiga goloctogag goscasgege 13440 acagactegg tettettigt gtotgigang otgigtgett tgcacagott oggggsonni 13500 18560 spotroccts someostite tienatence appretate opertenet scotrocce gootoscoso otgiteging tigatotgag sogagagooo aggiotootg octototgoo 13680 agreemente tocateesse sestetting georgiques grossicage scatagages ggacotguga tgggocacag tgocotgoto tgtgoctost occosocoza coctocottt 13740 CCREÁRCANA TOCOTOCCAT ACTORCCOGA COTORRCATO CAGCOTECTY AYECCCCCTA 13800 OTCTETGACO AACTEGGEG AGCATGACAG AACCGAATAC AAACTCCGTA CCTTAGAGST 13860

[図8]

CTCCCCCCTG GACAATetes gtggoodoca cgoodtgoco cattooggas gtoodtoodt 13920 13980 execttetto tootototee torentaese tensetaest sassistion sasassesses EXERCIONALE CONTRACTOR TORROTTES GASACCTEAT TORGGASATO TECCATTACC 14040 ASTACCTEAS CTOGCCCCAC CATGOOSTCC CCASTSASCC TOSSOSTUTC OTCASCTTCC 14100 TEGACCAGAT CAACCAGCGG CAGGAAAGTC TECCTCACGC AGEGCCCATC ATCGTGCACT 14160 SCASSTRARE atmatastco testestast artescapot escaptura tectectura 14220 tgocatgago tgitateago antataascy ttagotogos cattgagtgo cotocgotos 14280 eccocgett etcetgggte eccteatage tecagasece tgggtggate gtggetggas 14340 ocagoocoeo titggocoto tgocigigg tatoitocto agagocotoi coggatgico 14400 outotogoco ascoctgoca astacagage aggagecege gacacagtig etggocaggo 14450 ocsagotant cagagoasga correcarso accescanta recotetato correctecto 14520 egetitotot egaggicces tiotgitegi tiottotoco aggazoatot atgaggosig 14580 tgotcoccat toctostett ittocatogg tagocgcagg gottoggett ottoctgaot 14640 orgonototo tonoagotto conaggnagt goodcatoot ggoodcoagg gotgtgtggg 14700 gategetgat gottottigg ggotgoacat anotoctotg totatotaco ogcatettig 14780 tgatosggag acototesta agetgoagag gtessesote caaggaggag caggagttoo monggigago ocaotgagot ggoriggcot gggtggatga gaggcagtgg gtgcagggco 14880 potocgotta congotgtgt agtottggso anattaotta actittotae coctoaguit 14940 cotostotat anastosass totosasset stoatasasa otosetasa contatosti. 15000 15060 gtygotygam thoughougo cotommune tyggogotyt teotayttia gtaactoeca toaggoagag astaggggas tgggssootg octtgoccog gtocottcoc actcoctocg 15120 tggmoccoung gootgogmog goototggot tootcotett occocancan cigittetoc 15180 terracagre caugicaret gastotagas signocooga igagotetoo agresoroge 15240 ototetonte tentatotos gresosegno ostoocogne agotaccoto otyotoscoco 15300 googcacacac cattoscaca ottottgama googcatggo ottintiting mogitacage 15380 asgenegter stategers thattities contologe tigenatios acascopeo 15420 tcagagosto agottgotag gotcagotas egsteggoot egsatotoco tgagatotgt 15480 ttgoccageg oterganneg agnessatt potsotenen tentpocote agtcocctes 15540 contenues occasion attacase estatoott contenues acceptant 15600 grammagga agtgangoca tgotgagaga ogotoomina otoottongg gagaggoggg 15860 gargetong getacotung apocygong mongtaging gattinggg tocongulat . 15720 tocregeter rescarcoso tosctagues trementos soccesares transperse 15780 sagestagte gosgotague agoosgogto agosocgosg agooogsggt agogogtato

[図9]

categoagago terrecasaco tocatestes etteccoret esocoteguo sostiopoto 15900 15900 contonoter arrotoargo teotootete etgooteges oteragotea gogotegeta cottos egggagge ttgactggos totgatggos occoegtett teccesg060 CROCATORRO COCACARROCA COATCATTRE CATORACATE CTCATORAGA ACATOTOCAC 16080 CAARGETgag gagcacatgg gagtttgagg gtaggggatg agoegocoot oggtgtoogo 18140 ctateceter scotsagett tractacece coaccearGC CTGGACTUTG ACATTGACAT 18200 CCAGAAGACC ATCCAGATGG TECCGOCCCA GCGOTCGGGO ATGGTGCAGA COGAGGCGCA 16260 GTACAASTTC ATCTACSTEG CCATCSCCCA STTCATTBAA ACCACTAAGA AGAASCTGGA 16320 GETOCTECAS gigogigosy agosyggoot graveness exemptycas igosygates 16380 strocects sportentss saccepage thousantst contained seasTOSCAS 16440 AADGGCCAGG AGTCGGAGTA CGGCAADATC ACCTATOCCC CAGCGATGAA GAATGCCCAT 16500 SCCAASSCOT COCSCACCTO STCCAAgtga gtggcootga otgocsotgo coggoatoca cocottigio otgoccagoo cgatootoao titotggaga ggacaagtgi tgoagotggg 16620 aggacutggo ticaagtica agottegito tosoccotto tettostase ostituotes 16680 16740 stroccacae striverect ctgotaggts coarcasege actorists; saratatage ototytooto taggagotte gagtotagte cagggaocet agotgogtoa ootetgagao serstance esgregacte coagtgoogs stoccoctst gotstotoot sacotspace 16860 sactgootet actteccocc ctgcaccore otgcagACAC AASGAGGATG TGTATGAGAA 16920 CCTGCACACT AAGAACAAGA GGGAGGAGAA AUTGAAGAAG CAGCGGTCAG CAGACAAGGA 16080 BARBARCAAR GOTTCCCTCA AGAGGAAGTE AGCOGTGCTG TCCTCAGGTG GCCATGgtsc 17040 agoteticig cotgagigte ofcoorgone igocotgigt cottageten autgoottee troposasa cocceptasa contrata transposas googragas transposas 17160 strongente carstrons etacoptete actocoteae tocottetet texcarCCTC 17220 ABCOCTEACO CTOTEGAAGO, ATTTCGCGAT GGACAGACTC ACAACCTGAA CCTAGGAGTG 17280 OCCUATTOTT TTUTAATTTA AATGOCTGCA TOOCCOCCAC CTCTCCCTGA COCTGTATAT 17340 AGCOCAGOCA GGOCCCAGGO AGGGOCAADO OTTOTOGTOT TETAAATAAA GCCCTGGGAT 17400 CACTetetat ogoototese coctttent goodsgtgsg tergoggods gaggosgre 17460 17520 casesteret sactetetet gootoorten stroctores teasagoton goottoorte 17580 agacegacet sestogegao tocecotogo acetespase stescogtes stesagotoc congretore tottennet ggaggggat catanoning tagitgian assoncemi 17640 atgioggotg acquisages gggescagtg actoricaes egettgeest gtgeccagge 17700 sotsassigno tecacacett agticurtot aggosottot gioattotos tittacegig 17760 gogganote agggacages assotasets sottestoso tigocosage toscagget 17820

[図10]

stressout sarectures thosescoos excistotus occossusco oscentectt 17880 socotygagt tgosgotygg gocaccotos gygggggoot gatosocoto contgatgot 17940 gagttecaga tetguactan gangagtagt tascagoogs magegeagae etgaggeeng 18000 congretes toocototes organous encargotes tearagenes organosco 18060 cagotootoo ootoatooag googotgotg couttatoot uttgggoaga gittgaagag 18120 otseptuacs transparted tituttitit stoccotcit optionoos tetosepust 18180 ggggtttoit utttattiga sacaotggtg tnotggggag tanagooggt gggagtosto 18240 octorgens tgotggogoo cautootgga neggotgaga ongononggt connesgood 18360 agageotgus ogtgoattac teagceauto ettacagego coccegogto songgoatto songtocooc gaootcotgg sacttageng gotggtongg gage 18404 120

180

240

420

480

600

660

840

900

960

4020

4080

4200

4260

4320 4380

4440

4500

4560

4620

4740

4800

4880

4920

5040

6100

5160

5720

5340

RADO

5460

5520

5640

5700°

5760

5880

【図11】

totocotgae cagoutouta agittocagga ggioggggga oigtgasigo oigtgacgeo exempototy tangentity organizate cangoocego ototycgott tygganotyt sotatotoss cotttooses agtaseosco agoacttoot saguestrac tocoscosso titactocco aggacaccag tgittossat seagasgasa coccactcot gacatgggg ungunagany symonassa canaposoto ttomogtomy competetto semototyco configurate aggreeatous officerates fulfilled and factorist cooleast of 360 ctgaggagco tgtocotgtt cocgosagag gyracgcago cgggotggco toaggtotgo gottooggot gitamoteot ottottagit cagatotgga actoagoato aggagagigi gatuagggco cocotgaggg tggcocoago tgcaactoca gggtaaggag tgtgggotot aggatoagao agootagatt ogaatooong ootoaotatt contagooot atgaoottag gosagtgeco eagtisotta gtittiotgt cootcagtit cogcosoggi sisatgagas tgapagesgt gootsgactg sectasogtg tgtagtottt tegtgootgg goacatggos 720 agogtetget gagtosotet gooogtotta togtoagoog tostotoggt gottttosoa acceccotgt tatgatoguo otocattita asganggaga otggggagut toacceacgg tomocotoco mogigogagg oggagicocg mocomogico giotgacgga aggoggagot ttcsogogas gozogosogg aggososcas agttsoccat octgocotgo cototggoog occaptosot gggcaagosa agggotoaga ggogsososo ASTEATCCCA GGGCTTTATT 1020 TACAAGAGA BAAGGETTOG COCTGCCTGG GGCCTGGCTG GGCTATATAC AGGCTCAGGG ADABOTOGGO GOGATGCAGC CATITANATT ACAAAAGAAT GOGGCACTCC TAROTTCAGG 1140 THETBACTOT STOCATOOCS AAATOCTTCC ACAGGSTCAG SOCTGAGGST goodstgags 1200 PERACTERE MARTERERE STANCTERS COLUMNIES PROCESSASE STOTEFFECE 1260 gotgerango goagasteng gotgogroca coccatoono coagregang cogteraguo .1320 HERECAGER EXCHERECER EXAMENCED CHERCHERER SECTETACIA TOSCCACCTO AGGACAGGAO COCTCACTTC CTOTTGAGGG AACCCTTGOT CTTCTCCTTG TCTGCTGACC 1440 OCTOCITCIT CACTITOTCO TOCCIOTTET TOTTABIETE CASSITOTCA TACACATCOL 1500 CCTIGIGIOT gengeogest scassesses anticasse asttestsca setenzana 1560 CARCADARUE READCORNOA STREORNICO COLOTRODA COCCUETOTOS DARRIESCAD 1620 ageosogato cotgosotag acteonaget cotagaggeo agaggetaca tetestacac 1680 gagtgogotg otggtecota gosgaggoco sosogtgtgg. gosotcagga satgottatg 1740 ancaguages signsacca ageotypact tempcoage teccoccage tecascactt 1800 gtoctutoon genegigagy stogggotgy goeggacene gregiggaty cogggosgig 1860 PORTORER CONSTONOTT GRADGASSTE CONCASSION TESCATEGGE ATTOTTCATE 1920 OCTODEGRAT AGGTGATGIT CCCGTACTCC GACTGCTGCC CCTTCTGCGA otgtgggoag 1980

【図12】

segradegte spraggiget setocoagoa regucarete suscocatoo teoactroak OCCOCCOCO GOCCARROCC INSTATRCAS ECACCTRCAS GACCTCCASC TTOTTOTTAG 2100 TESTITICAAT SAACTOSECS ATOSCCACST ASATGAACTT STACTGCSCC TOCSTCTSCA 2160 OCATOCOCEA GOOCTOCECO COCADOATOT BEATESTOTT CTEGATETCA ATEITCACAET CCASCCOLER STREETEROS STORMANOCTO MERICORERO MEREGORANO MODERARESEO 2280 tentongoog conococcas accompart goocstcacc CTTGSTGGAG ATGTTCTCCA 2340 TEASCATUTO GATGACAATG ATGUTGCOTG TGCGGCCGAT GCCGGCGGtg ggmangoog 2400 ggggtgocat cagaggoosg toangoosto coogggangg gaggtaccos gogotoagot cagooocag gosooscagg agoagootga gootcoagtg atgggaggga atgtgoocag 2520 sytoacoggy casetysigs tegasettie occasitote categoracy otocacotor 2580 syctotyczy tyotyscyct systecoczy otycoaccet cottouctes topactucto 2640 gogocgasta oteasteeta gigagigget goccocasco egguagaset gggassessa 2700 asteceacea etgtoctgou guetocongg taccotgago cotocoogou totocotgan exagtistes asociatoro agosteguit oscitocciti ticcitossa occigangio 2820 arranages tarocottes songrappet gogggggoan agggtongra gantongra 2880 2040 areastross targesettt obctocttte pescootes sessesses eteasysses cocceggues accordaget gagoscages agoigatgoe etgagtogog etgicinati 3000 tosasoccag attgtosass stesoccocc acaccoactt cottoctgte acgtotasat 3060 manageounty appoints an amaginately managinately temperature appreciate 2120 agototoggg gatgggootg tocotgagag agcacaggac agagocgogt coccgguesg 2180 occasiones gosoctotas attospocas ottgocotat cocangadas acanotacte 3240 CHERRAGER AMERICOSE SERCOSTOGO RESOUTERES TODAUGERES SESTESSESS. ggaccagges aaggosgett occattooco tettototgo otgatgigag tteotasaot 3360 agtascagog cocagititt gagggotgao ggasticcag ocacanogat agggtotoat 3420 tensitotos ogeosecoci sessicotes tittecasat resenerote assettases 3480 3540 sagttaagta attigiccas gaccacacag ciggiaagcg gaggggcoot gosocoactg cototoateo accoaggeon gyocagoton gtgggotono otgtgguaco cotgotocto ottgozgoco concototgo noutraccag aggiutoutg atcaccamon tgogggtaga 3860 tagacagagg agitatgigo agoccomang asgostonoc cutococcac cagocciggg 3720 esccareate rescacteco terresagot erraragase gosquetose faagsagoor 3780 segocotyce gotecogety guesnagesy magnetycy egocostyco toetagetyt 3900 tentgresga agaaaccaan agaatgggao otogagagaa agoggagoag oogggaoa successful segrecated commonted consecutor transporter consecutor 3960

【図13】

extocorese tectostote tettiseese extremens esterisest correspens ototgaggan gataccoscs ggosgagggo casagtgggg ctggttocag conceptoon congretto temponte agregaccoa gragasgoog gregtesgog gagggosoto satgigogag otsacgitta tattgottat ascagotost ggosottago agistitaci totosgotgi cactactaco atcaggatta tostoctoso CTGCAGTGCA CDATGATGGG COCTECETEA GECARACTIT COTECCOCTE STITUATORES TOCARDADO TOARGACACO OCCAGNOTICA CTRONOACCO CATROTONOS CCANCITCARO TACTROTAAT SCCARATOTO COSAATCAGS TOTCCotaag cogaggacat agggtcagtg occoctooto totoggasca outostoust otoscootso cogeocapay eggagesoss gtocapayay gractocogy satgagesosy gacatagage coectoscal TGTCCASCGO 99ASACCTGT AASSTACGGA OTTTETATTC GOTTETOTCA TOCTCCCCCC ACTTGGTCAC ASAGTAGGGC CCATAAGCAC OCTOCATIOCO CACCTOCOCO CACTATOCCA COCATTTUTT CIEGORAREE CERETOREET ggggatgagg cacagagoag ggcactgtgg cocatocoag gtootgotot atgitotgag tgcctggcac oggcccasac atttgttgga tggacggatg ggctggcaga gaggcaggag scotgggoto togtotosga tosaccecce sceggtggtg aggostggco agocacttos coggtacate cattigicat teasessack tigocarage agreeatiate coogsagets tguassonso acagottoso agacacasat ascaccagt etgtgocoet gtgootogag garotoacar asscagetus cogressasa caccecepte assayoutes otsusassas ogłasttoto cototaggto otggagguae casgacutgg situacagug gaggosgogo tooggotgig tottoassas ogaggostot goonggonga gategigigg agagagtost ttoctarpar manatement tetromanes assecteurs acctements acteurests ctggggogg tgagoottom agagasgogt gogggtonga gggangocao cagacuttga stgecagged tingagtgeg autitatece asaggtgace aggageoutg gasgagattt osgasnysa gyasottgao compttigty tomogyatgy gatomottoe stygomycau egegggtgot gigtegggg agootgoagg ginageggoa gaotcoagag agatotatgg EXCERNING ACRESHEES COLUMNICOS DECENTRES CONCENTRE SERVICEMENTE gacagootgg asootgagto tggagotosg asgagocosg ggatgostgo agggatotgg gggtomogtt gtgtmgtoge geotttgtom otegooctom gtttocommo magggoogga contracco tgugatoost thotgoods greatoteact gotottogan thastegoat ESCORGANIO SCREENING STRONGERS EMPERATORIO OCTADOGGO CTTTOTCCAD CTCTCSGGTG GTCATBACEA TGACACOGCT GTTCTCCTGC CACGCCATCT OCCABAAGTC ATTRACCUTE OCCTOCAGAC AACCCTOOCT GOCGATGTAG GTCTTAGCGT TCTCATCAGG SCCTASCAGE TSSTTotage ognassegts gagagaegna occosagaea gtgagoccot

[図14]

treccearca carrectra accastroca costonosca tromaranto segottores 6000 titgoccago igiototgga totagggioo coccaccaga caggganito coagggocca goototooto coacgiggoo cacacigotg acCITGATGT AGITGGCATT GATGTAGTCG 6120 GACCOGGGGA TETTACTOTO COSTCCOTEC ASCATCACTO GOCTOTOGTO AACCEREGET 6180 gegoggagag gaggogagat getotgegtt agccagagac toeccacaco tgggtcagac octoctymno tancargous ttotestoto assasscrats assotteose resactates 6300 goageagggg tegaggatea totetatega gagagtgagg gagttoacaa agaggttgag 6360 agcarregen ascotgoots otgetastes esessonott otgenagens tagasgoott 6420 tiseasanse espagnotot stermente tengengate socootoote sostenases 6480 terageouty tengateasy sparscaput exproments centratouts sytematery goagootgag tgotoscaso scasaatest citerascoo trutteccot testutudo 66DO CONCINCOT TOCARACOCT ROTECAARTT OTTOACOTCC TECTTOTECA AACTOLENEN 6860 tuturutuur masstranos tongotocos asunuscut ocatourus arctoscute 6720 sustantian amministration and processes amministration and processes and 6780 gotgocacca octoagotgo coosgooctg coggtoccos contgoscCT CAAACTCCTC COADAAGCCA GCCTTGOCTG TATCCTCGGA CTCCTGCTTC TTGTTCAGTT CCAACACTCG 6900 STITCTCAATS TCAGCOGCAT TCACCCTCST SECATASTAC SSCREETE ESPREENESS 6960 sgasgicago asotosgaga toccagaago toacatotga argacagoto argagaagtg 7020 EMERGEORGO LEGGOCOROS COLGROCTEC CECARSTAGA CAAAGGCGCC TEAGECCTCC ТОЛАТОСССЯ ТОТТОТТОЛА АТБОТССАСС АБВІТОСЯТВА ВОСТЯТОЗЛА ВОТОТОСЛАЛ 7140 CCACCCACTS THTAGCSTCC ACCOMMENT ENgoceastt approattos caggactiga 7200 gtotecotco etggatecco ageottguat toangueoug gongaccoto cotgounce 7260 acactetget cacagacage agoctoagos gaggotocco ogocgootag otgoottacC 7320 TOGGACATGA COTTGATOTO GOTGACCOTO AGCOGGGAGO CTGGGCCAGO CTTGGCCTGG ТСАСТВАВСА САВАЛЛОСАС ВАЛЕТСТССА ОСОТОВСТВА ООСТОТОЛОВ САСЛАВАЛАС 7440 STOCARGEOT COCCUTTOSC CTOCAGCAGO STOTCTSCOT SCCCGCCAGA CATSTOGCCA 7500 TOSTACCACO terrenergo escutorere esexteneso congeccace exernesco 7560 ctgagoagag scattoscar sympagoog genetoesgo soctactete tgoonggono 7620 tgogotecat gottocaset coeccucoto attaggtot otcacessos tgotgagago 7740 taggining attacoccos tittstagni gagganactg acgotgagot, gitactosci excotegago cottgactge ctotagggos agottcoaga gototattgo coaggotaga 7800 7860 gtgcagtggo gcggttacag ctototgcag cotogaccto coazetteas gccatocteg cotocagagt totacocgag citoguacoc agagoccaco totganagao aganagactg

【図15】

gonstatton anetatting agrangency ctangentus atotocytes arentageno 6040 tetrococay caregaccay agressages asserceded crargocade concurrent testences tenacaceca gactoragto acangering construent eceptocyco seggaggogg sgasgacaac cocacteggg saagagtest staggeggtt ctgggggtgoc 8160 oteratesty temoteracy sympocomy stitumnosy attiguages sotgionesy B220 cagasagong enctanguou titocougan guacaccoct tipocaggag ganaciging 8280 coorsears coorsecce enganeses ogigatesus assectones seteettets 8340 remagnent gagnartene gttgtgaget ttootcagoo ongegoogae greagegeer 8400 gonastitto cancogongg gatgayayan agangayan gaccagtoty toccanocca RASO totoaccoot goodgaggt gastooggos gagagasooc cagagostos taacccoact 8520 rescinctio aguocaucho otserracas guiaganous caustagues seassasset 8580 gagoccotto cotoaggoes caggatgagg angtotocat goanatgtes agotgacoad eggengogon gagooncogn gggnongatg canattotog cagaggagga ggogononga 8700 casegoagag gacacagoag escotgegag esagagooto toscacacto conggotoag 8760 aggigacact agotoctaga acquatoaco cassanacco tocastacas ottocotast 8820 ottemoctoc egeocogges etgeocotoce tteettetet etettetets ttetcettgs acceangest caresteste treargress tostigueses strutustat ettoacoto 8940 carrentur terrecegto etecteteet guetgragge maggagasag agaggacatg 9000 agotttagag matotoggtg commangood ootgagtgtt goggtgggga agaggmaggg 0060 CAPTURE OR ACROSTRATCO RECORDANCE EXUTORORS ENGREENESS SCOTTERARS 9120 aggoczatou agganaggag gontocong tgggocaong ggotgonoug tgacoganto 9180 caputoteng titonatong tgoottgeoo manantattg atgoagtttg gaggoogsa 9240 totosgagag gotgosagot ggcaggagca aggittoccas testitosat ascogatoca 9200 trastgouge gatecaogge sagageanst eggetteroo casegetgon tetrasagoe 9260 ocotagogit mitoogotgo cotttactot maggagatot ggcattgaga tgoggotgot 9420 guanggagon atggtgtoat gaggagoatt cagagoccco agoccocago coatgoottt 9480 gggagaccan aggaggagto ggggaggoca caggagggas atgootggag tuttectots 9540 INDOORREGO SECRISSINO SCILLACOCO ESTESSOSCI LOSCALOSTE DICTOSSINA 9600 tototettie georgasen otattigaco concegnon naccontoco naccessore 9680 otggmonag gostonagtg tottggmang cattostcoc catottenco constgtong ctoclosoty tootsacsty tgotsgratty aggreeoese gyaggaageo sgrotogatt 9780 congregues sugarottic tancancega goiggootgo acquestrot grococcare DRAO" agtgeoctoc otgtotocag tgggacotgg gttgcagcgg coarggotco oggagtaggg. 9900

[図16]

oresponent thousands tootogenest territores mestanters thereofoth 0960 10020 ARROADORER TODOSERSOS ECRETERES EXPACATICA EMECOCOREO TESTECRES agggengagg stggagggta ggoagogoog gotgooagto tocotgooto octggotgtt CHESTERS GOOGOTON OCCUPATER SHATSFORES ESTECHENO COTONOUTU 10140 CACTACTORS ATCOCAGOCAR TICAGOORGE ACTERARSTS SATUATEGES COSTOCOCCET 10200 CCTBCAGGAC ACCCTGCTGC TGAGTGTAGT ACTCCACCAG CTGTGTCAGA GTGGCAAACT 10260 TOTOCCCTCC ATACAGGTCA TAGAAATCCC CTGAGTTOTG GATCCGAATA TGGGTCACCT 10320 SATOCOCCAO Cotgosgugo socsgeoggi gagrocagto ggigosguag tagasgoagu 10380 agggongga toggotgagg tootgagtag aggonoment aggontgagt aggenesiac 10440 ARRESTAGES AUTHORISE THEORY SERVICES CHARACTERS CONTECUED 10500 suganocage entgagtest toassgoots sategoaona sasastegoo sasatgoods 10560 EESTIGOSES SESCOOROOT ACCTEACEGA GASCEAGAAG TCACCCTGGT TOTTGOGAGT GGGCDGAGCO ASGAAGCTAC CGTGGACACC TCGGCCCTTG AGCADGGTCT CTGCATCCAG 10680 COCACTGARG TCTCOGTGAA ACCACCTERE CRECCCAREC REFECRETES ERRERESTOO 10740 ogianyonco agreeoccit goctopisto tacceteset accargopot tacCTCACCA 10800 TOCTOGOGGO TTCCGGAGAG GAAGGGGCCC CAGGGAATGA GGAGGTGCAG CTAGTCTGGG 10360 CARRICADADA RICTICARRICAC TAMBUCTUAR ATRICABUTCO GARTBOOGGE COSDUTUACO 10920 ACCCCCGGTG GTCCCAGTTC TGGGGCTGCC ACTCCACTgg cotggggggg cogggcagggc 10980 EXCERCAGES ASSESSORES OCCRECOCCT REFERENCES SCHEETSCHE STORTHER 11040 11100 agonougous exusavoras gosgarousy staroactes erstaureso exercocact toocsonogt ofgonztona aggotongga gostggoett goscatstgt gacanoscat 11160 guagtasuga cacatututu outigoscan tonaggocoa gataataott cacguatucu 11220 saccongang giocoanggo atototocot cotocaccag eigotitian guagocotoc 11280 otgroccang otgateaces tratagoget guoseoteto etogagtene toutgotege. 11340 tgoogggogu tgtgutataa tggogttoan atgosttgtu tgattggttt dtoaccacag 11400 cootatgaes caggagotat otttatoatt ttacagacaa agaacctgag gotoaggag 11460 titianggost igootgagto catcagting tongotgosg tgoonggatt consoconga 11520 cagtooggit cohangoong tgottignan tootstacan cagoootong ggottonnag 11580 ascapagett asgagootco tigiconsar regotrocat geragoses gactastagi 11840 tampeoutty occartgotty cangagagas gggtgccoto ototaacces catatgongt 11700 tigicostgo cacigiggos gaggatges cascatgeco cigagosque cistosacat 11760 and court in the state of the s 11820 outstotoot gegegetegg gescangeto etcaccatge cteattttot cagegotegt 11880

【図17】

testotters succotesao actessetat atestsotro otecctatas ttocasatec 11940 ERRCHICHEG, ROOGOCHERO CHERROGREE BREEGCOGOT CHRONIEGE THORITERES 12000 apacatatta atarottoco otaresares anactresta sotzenesao asesotares 12060 gagacactty gitototaca taccittitig antititatat gatgaguatg cattaccitt 19170 atmansates statectesc terrescent ticteress cititagest somereure 12180 ctotttetot otatoterat gotettteca tersteteta teasogtesa stigspogra 12240 ogoagtggot cacgootgta stoocagoso titigggaggo caaggotggo ggatosogag gtonggagat ogngaconto otggoonnon tggtgansoo coctototao tananataca 12380 namenating otgggostgg tggtgggogo otgtsatooo agoteotogg gaggttgaag 12420 12480 CHERRENTO ACTIVADOCO ESPERSOCA RELEXORES ARGORESTO ECACCACTEO 12540 actoragout ggossozong tasgactota titonamana amananama tggagoomgg tigigigott entattinig escattatgo sigitotgot toaggiages gasgapeses 12600 tiliasgoco seosastota attitoccat gatasotaca tistoatiti tagassosto 12660 mancatomat gitticocco amemnaggot titocactit totitotito tititigitot 12720 attiatitot gattitotto totosofgat gocofgagge atotgoctus tagattiett. 12780 gostgytoca gotttgacta occottoago ttggacacoa coccagagoo cogganatoo 12840 goggescoco cacgocosno gocastgago sagasgagoù cutgossago tggotgosgo 12900 gorgesonoe ogotgogot otogotosto toggagtgit cagagtecag tgogatgoot 12960 gguardgago sagigitosa casacasgot ogtosgicos tagocacata cotagocaca 13020 agtacagett cotgetoeta cacacacago etgottetoa teogoaggoa agggigoaca 13080 cucagiones gonoscacao otonicatos atgiocecot soncecatao otggiocegi 13140 gracetooco mogostggma cataantotg soosconog sagtitiong tocatgoton. 13200 cossang cocsofgoso cotegoccos sgacectoot tecangett assoccactt 13260 metregance sattagotog gonocourns essectagot agroecotot tootsaccon 19920 13380 tegragage aggesttoot otgangegty tonegooneg agacagenot cagacages giacagotto igotatecti iggeaggasa sinasassot sectecetta cottageatg 18440 statement tecapatose titosestse segutotest tiaggostes sucapocots 18500 tgatgtagga atcetttico ocattitott atgggoggaa accagogtag ggagacteag 13560 sattaceagu gtesatgoot geteattong ungammanne tetitootte gaugosekus 18620 gataunagta gagatesags consequent tegetenego etgtaateco ageaetitgt 13680 EMMERICANCE OTHER RESTREET ACTIONS OF SELECTIONS SCHOOLSES ANACOTEME 18740 essocoteto totacansan atacanantt tagocagate testagosca cocotetago 13800 congetect terragents agatement atogetting cotgagetes togagette 13980

【図18】

agtgagocat ggitgigoca otginatoog gootgggiga ougagigaga occigiotea mantana stacegotgy gogosytymo ttmoscotyt satoponyca otitygynyg 13980 communication apprehencit greatcarge sticgrence arcterious cacestiguas 14040 occostotot actercotet astoccarot totocresse teragetteo astragecea 14100 gatoatgoca oogoactoca gootgegoes oagagtgasu otoogtotoa saassaassa 14160 sattananc catacagato sugatosutg gigutacang sagataggea giotggango gnasscaagy casastanto tytegessyt totygesoty ototysycot cagastocco 14280 gootgacean tgagotteso estatttoco asstactgat gtgassagot gytesgtggo 14340 aggettions igoigousgo tittacetta tactettaat cotcaggous spootsotta 14400 ginggigits tioecoccest titegenson generotage ofcagagate tiengiasti 14480 guocasgito acasgutagt gagtaguag gtgggtanan cacagotato agauguuggs 14520 gootggtgoo ottiococca acasocatec tgcagcagac agcgtcgggg gcagatggga 14580 tergrantgo cacagocont gateganggt ggaggangan gtgotococo agaggoanca 14840 14700 terstoness conserned gosogososs extococety recentront exceptuago aspocatety gotggagosa agttettoty agaggteres accordotyt agagggtost 14780 tenaggeoug gotgagaane caaggatgan atotgracon ggggaggoot ggocangeta 14820 cotggoegga mantuscoso agangganto aggganosga agantoagta gganococat 14880 czetyszyco gacagtgaca agatgtycae tegggeagyg goagacatya stytyagung 14940 CARRESTORY DEFENDATE PROCESCOR COCRCERCT CECCRETACT CTRIENCOR 15000 stigiosott titotittot tittititt tittigagat ggagtototo cogotgosot 15060 carrotypay twosytgaog castotoggo tosotycaso otocgootoo tyesttosay 15120 castictoot gootoegoot coctagiago teggactoso aggigogoso cocigigoos 15180 gootsettit tittitetat otttagtige geoggestit ceccetatig goosgotge 15240 tottgamoto otgacotogt gutccocotg cotcagcoto commartgot gggatteong gottangoon controcong cognitation cititiotit titotitoga cognitates stitutett tistisset ististiing motgagigte mottitiett titotiisset 15420 tigittiett teitteette etteettite titettett eterefeitt eettitte 15480 ottottiato tittiotito tipotiocet toottotito attocoloio tittittitt 15540 tittitigno mongastott gottlatono conggotgua gigongigio monatocano tonotgongo giognocico tiggotongg tgatoctoci goctongoci tecangiano 15660 tgagaccaca ggtgoatgoo actacatoca gotatttatt agtagtaata gtagtogtag 15720 tortesture satementat atcoctetet teccceret retatienes tottessots 16780 sagigatest occasoring octoscasso igotagasot socscatest igggocates 15840

[図19]

tacoccaptat tittititas tagagatggg giotototat gitgoccagg otggittisa 15900 actorigago tosagosato ttoccootto ggootoccas agtgotgres toscagacet 15960 gogoczosto atotogiczą gitticzoti towacztost agotoczacz tegintance 16020 tgetgiggee atgesteege tecastaggy testotgees ogggesesst giostititi tgtttgttoc cacattaggg otttgtgcto accatotoct etgoccagag atgettgact 16140 citigateact acgreacate gocagoteet ettectocte atcogggiet engoteannt 18200 giosoctoot ogggaaggee tocotgatee etccagetag tastgiosee tgesescoes 16260 gtoactigot agostatgas gotggttoat titottitit tittititit tigagnosag 18320 gtotomotot gtogocomgg otggtgtgom gtggtgomet omtogotgac tgomgoottg acctoroage otcasgosay cototoscot tagoctotoo atagotggas coacaggacy 16440 tetecoscos osocoscots atticitati titigingag monggetoto scietatigs 16500 16560 coaggotagt otomeston igagotomag cantoninto geotoageot ocoscapteo tegentosca ggigigasco actacacong goosaggoig toistittoi gogiastaci 16620 totgaganto tgonatgato cantitatig agitatitgi toggiotgia soctoccaci agustatens ofcontensa sossassoci tetotetott ettosotoca etettacoas 16740 catottasso agoacotggt gostastage tgotcascac gtacotgttg satgastgat 16800 gonggggues gggasgiges agganoones gengatgggs consectots stattggges 16860 ETECHNARIA ETTERCTERA CETHERREEK COTTCGCERE TERCOTOTRA OTGOTETET 10920 traggigite igagotacco arreguecas stociassos sussessos songgascoc 18980 agaggotgan agtagoaatg castgyagag ancagataoa capttatoon gagganaatg 17040 ttenegagge agregagges catgagtene coggregato tomomouts ogegangggs 17100 augitosing genocygana caggogodgy gongogong singosoton cyticacaca . 17160 ogtograpty agoatoanon angonotoco tocotocana actmacagea gautgeracu construing constructs of CACGGAC ASCATCTCTC TOTAGGRAGG GGRAAGCCAG 17280 DOCCERAGEOC COCAGEOGEC EGGECTOROC CAGOSCORCA ECTOTECROR GTDGCCCARG 17340 CCAGGTGAGG AAGAACCGCT CAGTAATGAG CCAGTTOCTG CTCGATCCTG CCTGCCAGGC 17400 CAATEGOROT gosgugaces accordigant astagtotco aggaseauge caugingsgo ERECTERO CERENCORCO CHCRECERO ARCTECCCE CHCCCCCRR GOUGGESTRO 17520 agoaggooog outgoiggto cagggoogoe ticcoccagg agaggagag coacciggag 17590 ctrosoctes agotomagot gacagagoge organistic getaggegan cagacoagen 17640 agtasocoty gotgaggaag agosaconat gggggaaacc totcogtagg ogganocan 17700 aggroctuag gasantocot sacagoocag theeteagag saggagetso cocotytyca 17,760 EXOCCACOOR OCCARGODO ESERGISCOO ROTOCAGOOT OTCARCOTGO COCGERGORE 17820

[図21]

ATOCTOTOCO OTOGOTOGIT TOACCEADAD CTCAGTOGGO TEGATOCADA GACCOTOCTO AAGGOCCEAG GTGTCCACGG TAGCTTCCTG GCTCGGCCCA GTCGCAAGAA CCAGGGTGAC TTCTCGCTCT CCGTCAGGGT GGGGGATCAG GTGACCCATA TTCGGATCCA GAACTCAGGG 180 BATTTCTATE ACCTETATOR ACCCEAGAGE TTTGCGACTC TOACAGAGCT GGTGGAGTAC 240 300 TACACTOARD ADDARGETGT OCTGCARDAD OGCCCACERDA COATCATCCA CCTCAADTAC CONCTRAACT GOTCOBATCO CACTARTGAS ASSTCRITADO ATORICCACAT STOTEGORGE 360 CARGOLAGAGA COCTOCTOCA GOCCAAGGEC BAGCOCTOGA COTTTCTTGT GCGTGAGAGC 420 CTCAGCCAGO CTGCAGACATT CGTGCTTTCT GTGCTCAGTG ACCAGCCCAA GGCTGGCCCA 480 540 SECTORDER TRANSCICAC COACATOAAS STOATSTEED AGEOTEGACS CTACACASTS 600 GATGOTTTGG AGACOTTOGA CAGCOTCACG GACOTGGTAG AGCATTTCAA GAAGACGGGG 860 ATTOAGGAGG COTCAGGOOD CITTUTOTAC CTGCGGCAGG CGTAGTATGC CACGAGGGTG AATGCGGCTG ACATTGAGAA COGAGTOTTG GAACTGAACA AGAAGCAGGA GTCCGAGGAT 720 ACAGCCAAGG CTDGCTTCTG GGAGGAGTTT GAGAGTTTGC AGAAGCAGGA GGTGAAGAAC 780 840 TTECACCAGO STOTOGRAGO SCASCOGOCA GAGAACAAGO SCAARAACO CTACAAGAAC ATTOTOCOCT TTEACCACAG CCEAGTEATC CTGCAGGGAG GGGACAGTAA CATCOCCGGG 900 TOCCACTACA TCAATGCCAA CTACATCAAG AACCAGCTEC TAGGCCCTGA TGAGAACGCT 960 AAGACCTACA TOGOCAGOCA GGGOTOTOTO GAGGCCACGO TCAATGACTT GTGGCAGATO 1020 SCOTTOGGASG AGAACASCOS TETCATOGTC ATGACCACCO SASAGGTESIA GAAASGOCGS 1080 AACAAATECS TOCCATACTE ECOCGASGTS GECATECAGC STECTTATEG SCCCTACTCT 1140 STEACCAACT GOGGGGAGCA TGACACAGC GAATACAAAG TCCGTACCTT ACAGGTCTCC 1200 COGCTOGACA ATGGACACOT CATTOGGGAG ATCTGGCATT ACCAGTACCT BAGCTGGCCC 1260 BACCATOGGO TOCCCARTOA ECCTROGGOT STCCTCARCT TCCTGGACGA SATCAACCAS 1320 COGCASGAAA GYOTGOCTOA OGCAGOGCCC ATCATCUTGC ACTGCAGOGC OGGCATCGGC CHRACAGECA CONTRATTET CATCEACATE CTCATGEAGA ACATCTCCAC CAAGEGCCTG EACTETEACA TTGACATOCA GAAGACCATO GAEATGETEG BEGGGCAEGG CTCGGGCATG 1500 ETGCAGAGG AGGOGCAETA CAAGTTCATC TADETEGCCA TOBOCCAGTT CATTGAAACC 1560 AUTAABAAGA AOCTOGAGGT OCTOCAGTOG CAGAAGGGCC AGGAGTOGGA GTACGGGAAC 1620 ATCACCTATC -CCCCASCOAT GAASAATGCC CATGCCAAGG CCTCCCGCAC CTCGTCCAAA 1660 CACAAGGAGG ATGTGTATGA GAACCTGCAC ACTAAGAACA AGAGGGAGGA GAAAGTGAAG 1740 AAGCAGCGET CAGCAGACAA GGAGAAGAGC AAGGGTTCCC TCAAGAGGAA GTGA 1794

[図22]

N				C
8H2	Γ	5H2	PTPasa Domain	C-terminal

【図20】

grandento otongetage gitagecoot augrospert tageocome osgracosta	17890
ESTABLISHED Executable spacescook transledge absenced forthable.	17940
teggestigt orgatoogca agagaotgao accampute agtoscaggo goatttatta	18000
tigtotggas ostonaggoo titootoooo iggoagiggo sonagggagg gcommototo	18060
aggaggoggo caogotgoca coagoagoag goocatgagg tagcagggto atgganggoa	18120
gasacegogo ottosgotty ootgaceggo tggogatoto aggatoctgy gottogtagg	18180
sotignocan gogagoanso timaggacan otgonagang gagtggangg tomocotto	18240
tootsaggad cagogtgoot sagmoscotg gagggggtgg tagtotungo atganotgot	18300
occoracter oterscanot attitocasa canaccost scannoctot atocomists	18360
stitignates tencetities totacecies goaceacies ates	18404

【図23】

MYRWFHRDLSGLDAETLLKGRGYHGSFLARPSRKNQGDFSLSYRYGDQYTHIRIQNSG
DFYDLYGGEKFATLTELVEYYTQQQGVLQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSG
GQAETLLQAKGEPWTFLVRESLSQPGDFVLSVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRY
TVGGLETFDSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYYATRVNAADIENRVLELNKKQESE
DTAKAGFWEEFESLOKQEVKNLHORLEGQRPENKGKNRYXNILPFDHSRVILQGRDSNI
PGSDYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVE
KGRNKCVPYWPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQ
YLSWPDHGVPSEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCSAGIGRTGTIIVIDMLMENIST
KGLDCDIDIOKTIQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVALAGFIETTKKKLEVLQSQKGQESEY
GNITYPPAMROVAHAKASRTSSKHKEDVYENLHTKNKREEKYKKQRSADKEKSKGSLKRIK

780

1020

1080

1200

1260

1320

1380

1440

1500

1560

1620

1580

1740

1800

1860

1920

2040

【図24】

autocotott goaggigtoo tisagittgo toottegio sagicoto asgoccagga 240 tootgagat congoctgt caggonagot gaage otg tttotgo contracoct gooscoccat gggcctgotg otggtggoag ogtggogoc tootgagagt tggpootooc tigigoosot goonggggag gaanggoott gatgitoong constantes atgiootgi 420 gastiagest tagiglossi stottamings octasesses occatatote ettocotest 480 tocototgoo titocaggoo coatococot gascagotoo tocotatggt cotggotggg 540 cotasocote ooccagegoc tascoctaco tesegotoct cocottocco Esegotest tgagaggotg gagtgggtoo otoagggooc tgagtgagtg agcotgoaca gggggtacot 660 cottototga ggasotgggo tgttsgagat tttccttagg ccotttggtt tomoctagg 720 gagaggitto oppositiest teotottoot osecongest taottootes totattooog teccosateo como to tgtosgotte agotocaggt ggagotcoag gtggotcoto 840 ctotoc gg ggesge go cotggscosg cegggggc tgotgtecte chotttggg gotgoaggga agotggo tgtggg gt ot gggccag occ cocca cotgtocttt 950 tootggagao tattagtoos gggtttgtoo otgoegtgoo ATTGGCCTGG CAGGCAGGAT MAGGAGGAA GTGGCTEATT ACTGAGCGGT TCTTCCTCAC CTGGCTTGGG CCACTGTGCA CASCTATECC ACTEDOTICAS COCCAGOCCC TECRACOCTO .1140 TACAGAGAGA TOCTOTOCH TGGgtsagto chegcacoa thegggtoco agtotoctgt tagttttega gegagggagg gotttgttga tgotcactor autigtgtgtg autigegtg Matolgo otgoocts cotstitc stocctats acticount companyst gtgaggacco of gotoact catgotocto tgooccotot ttsacatttt cocctggaca agtgtgtato tgttototoc attgoattto tacttocage ototgegoto otgottotgo ctootgotta ggacotgtoo cootgggtag otoscascac otossacata goagtoagag goosco asgrocotco cantocago casottoto cacttocas sostospact ttegtopat ettettisti teettisaet tooottioge etgestesti cattossess gta tgttg agoatotatt atgoacosgg tgotgtttas gatgotggta etsotggagt gasosogaca gacategtot ofgototos gagottaca thooagtggg aggitacaga cassat escocentes attgentest tycapattot cagasgisti amcagazas tagacagoot tego meets tagteettos cacctetest cocagosote tereserote segmagage stigotigas cocagagit tgagaccago otggocasta tagigagaco otgiototec sesseineg sestingotg getgigging cacemitoct giggiticas ctatgagag gotaaggtga gaggottgot tgagootgug aggtosaggo tgoagtosgo gatgattgon constgones ocagootggg macagagtg agacottgto tonamenana 2100 sasasasas gasastgasc cagottosta tgotagonag tgaotgagtg tgoagatgac 2160

[図25]

【図26】

GGGAAGGGTCTACCCTĆGGCĊGCĊG

GGGAAGGTUTAUUUTEGGUEGUEG

【図27】

ttatttagtt gigtttagig ingattagat-gitattattt enatteteog ggstageggi tigiatgogt titgitiggt comingitigt tiagitaging geographagi timigitiag 120 attettatit tiitiaggig tittaggtao gttggttitt aggagaaggg tigatitttt 180 stitititt glaggigttt ttaagtitgt togtitggti sagtitiacg sagtitagga 240 titigagato gitagitigi taggiangit ganggogita tititgicat tinivatiti 300 strattitat gegittigtig tiggigging ogtgetogit tittgagngt tggittitti 360 tigigitati gitaggggag ganaggtitt gatgtitteg stantastan nigogtitgi 420 gattlagtit tggtgitagt tttttgcgga tttgateatt tttatittt tttttttgat 480 titittigit tilitagett ttatittttt gaatagittt tititatget titggtiger 540 titestitig tittegggtt teettiisti tgaggttiti titititit carrateggt 600 tungagutte gagtegettt tittagogitt teggigggig sgittetata gegggtatti 660 tttttttga ggsattgggt tgitagggat tttttttagg ttttttggtt ttogittog 720 gagaggitti titiatiggi igittititti tagitagggi tattittigg ittgittitt 780 tattiamint ttogtogttt tgttagttig agittiaggi ggagttiteg gtggttittt 840 tittttoggg-ggmaggoggt tttggattag taggogggtt tgttgtattt togtittggg 900 gttgtaggga agttggtogt tgtgggoggt ttogggttag titogtitte titgttittt 980 ttttggagat tattagttte gggttigttt tigtagtgtt ATTOGTTT6G TAGGTAGGAT 1020 COAGGAGGA GTGGTTGATT ATTGAGGGT TTTTTTTAT TTGGTTTGGG TTATTGTGTA 1080 TABITETETC GITCETITAG TITCETTTIT TECSOTTITT CETCSTSSIT TITTITTIT 1140 TATAGAGAGA TETTETTTCG TOGEtaartt togggtette toggggtitt agttittet 1200 tegittigga gagagagagg gittigitga igitiatito gaogigigig aacqigagig 1260 ogattigtog tigtilitgog titgiliting gittitlatga attitititt tingtanggi 1320 stgaggattt toggittatt tatgittitit tgtttttttt tteatatttt ttiliggate 1380 agtatgtatt tgittittit attgtattit tattitlagi titteggitt tigititigi 1440 tttttettia gyattigitt tittgggtag titataatst titagstata giggttegag 1500 gitatiogog maggittitt tacgittagt taattittto gistiitita sisitagati 1560 tiggtilist tititiigit tittittatt tittititt, tigtalisit tatitostes 1620 gteogtette egtetttett etgtettege tettettee getettegte etettegeet 1680 gantangata gatatgatti tigittitiac ggagittata tittagiaga aggitataga 1740 togastesst satttastes attgratist tgtegatitt tegasgtatt sostegassa 1800 tagatagitt tagtogagitg tagtogitta tattigigat titaginitg igggaggitg 1880 aggogagagg attettigag tittaggagti igagattagi itagitaata iagigagatt 1920

tigititiat assensing austingtig gatgiggigg totacgitti giggiiting

[図28]

tistgragas gitaassisa gaggitigit igagitissa appitaassi istagitaso 2040 gatgatigta ttattgtata tingtitung ogatagagig agattitgit tiasas 2100 assessess geneatgest togittists tottagtest toattegging totaggingst 2160 attattagtt ggagggatta gggaggtttt ttogaggagg tgatatttga gttgagatto 2220 swatgagger geagaggagt iggitatyiy sogiagigat taagagitaa stattitigg 2280 gtagaggaga tegtgagtat assettttas teteggaata astasassas egatagtete 2340 ttogtgetes eggettties tegescopes stemestiat estemetter attetetter 2400 ngttaggatg tigasagiga asstitgacg egatgaggig gogtacgitt gigatitieg 2460 talttiggen ggtogonggg ggangatigt tigngitter gagtitamen tingtitggg 2520 testatagag agattitatt titattassa assastatig ggiatgatgg titasgiatg 2580 testestiti estestitus sevetteses tessessett ettisastit essestities 2640 gattatttig ggtastatag ggagagattt tatttttatt sogattsoga ttattattat 2700 tattastass tagtiggate tagtestate tattigiest titustiatt tegnageite 2760 oggtaggagg attettigag tinaggaggt ognogitgia gigugtigga tigigutati 2820 gintittegt tigggigete enginegatt tigtgitnen menanassen menagagegg 2880 2940 THERESE STREETED STREETED STREETED SERVICES STREETED SHEETERSTE OGREGATION CONSTRUCTE GOOGLOOGER BARRESTON STREETHON CARRESTON nagtgatait tagtoganag anganaggan agammangan anagtgatan toggtogana gnaanaagaa mangigataa toggiigggi atggiggiii aagiiigtaa tittagiati 3120 ttgggaggto gaggtaggtg getteogagg ttaggagttt aagattagtt tggitaatat 3180 3240 getgezettt tettitaatt sangetetaa assennantt agetigetet agtgetgogt stitigings titiagitati aggregatig agginggara attgitigas ittagunggo . 3300 susuetteta greatrogas atteogram tetattitas tituagista sormanasa tittatitta masannansa sannaganna gannangiga tantiigitt atagagiati-3420 geogagitty teggitgestis gittittegt titgitgatt titgititti ataliiaigt 3540 tigittitet titogietat attitettat tetogetitt atgesteree tittigites stittitest tittgattto stitstest attitittet taggiagitt egitagetti tttttegigt agattitatt ttiggittit tagittggit tigaatgatt tiitatagta gggtttttat ttittegest satttigttt tegttatetg gttigtttac ggtteggtat tgittatgig gattitgigo gigttattit titgittige titatgitgi tittggggga statititit tittattitt tetteisset tetseteste titattitet tiettitese 3840 ogtigitigt igtagisigg tigitggggg assganist eggittoggo gittgategi ogtgitttet ttattittt atttettagt tigigatitt gagtesttet tientettit

3000

3060

3360

3480

3500

3860

3720

[図29]

tgagttitag tititgitti tamastiggg tgomtamist tisitangin gegitggitt 4020 goggattant agistastet assagtiegt agistigsse titigitati tettegtitt tisistiagi sittigggasa tattettagg titattigit aggoggggat titigaggitt 4140 agagtagttt tagasttitt tatagatiat titigtitigt tigogttitt agattgilia 4200 tttttttgta ttattatiga tittgatite tatesttttt antitttitt titttensag 4260 ggagtttiat titgitgitt aggtiggagt goggiggtat gettioggit tattgtaatt 4320 titiatittit gagaagitgg gattataggt tagtagagat gggattitet tgtgttgttt 4380 agtiggitto goattiitga tiitaagiga tiittitatt toggittitti maagigtigg 4440 gettetagget gtaggttatt gcgttiggtt gtgtittat titttgaggt agggttigt 4500 titettetti agetoggati atagiggisi sattaiggit teligiagii togattetti 4580 taggittagg ogsittlitt stittagtit titaggistt tagggitate gangistati 4620 attotalitig gitesattit gtettittig tegegategg gittiliteg gittittegg 4680 ttgittitaa attiggigit asginaltin itagittist tittataang igitgggsit 4740 stargogica attoticogi tigattites titttettit tettititis titttasses 4800 satatititt tittignat tattaggiat trattitigt nattittagt tilittaggi 4860 tigittitet itatuagasa siguegasa teatititat attatuaget igittuaget 4920 ttanatgaga togigtatgi ganagigati tetanatiti etattatgit asgginages 4980 aggingitit itaitittit gitaanget agtegenett gistititig titgagitti E040 mittitiest tiestettit tiesessest titistitit titetevett ervanusest **5100** gittagitag tilttitigg gigtogagit matitititt tottmaging gittangitt 5160 terangenet ettiterest taggetetas terecettte etetteneta teratityan 5220 etitogiste igglingati inigititat gogiggggat. giginiogga itagginigi 5280 gistagging atalgeatge teagetetet gietteteat igistatete tittitette 5340 ogiatgates giaggitate igigiagrat ingenegits tattigiest ingetatete 5400 gitategatt geogagitie titetigaat attigities tettagetat ogiatigat 5480 ttigaatatt togagatgag ogagagogit agogggtgit togogitgia gitagittig 5520 tatgtgttit ittigttitt iggogtiggg ogigggggit togoggatti toggggttit 5580 sessingtet theautions sessiontia sestiment atstaction titalianut 5840 agattitita gugtattagt gagagaagaa aattagaaat aastumaata aasagaaga 5700 segennegig generatitit titiggggge asstattgat gitigatgit titesseatg 5760 stantglagt tettatgggs senttagett tettgggttt mesettlitt titttttat ttenegtega atatgiotee tettetees tettenetat atesitiggi titettitit FRRO tttittitit gasatagagt titatigigt igitaggitg gagigiagig gigigattit 5940

【図30】

ggitogtigt estiliggit tittgggitt segigetitt titgitites titttogsgi 6000 egitgggett steggogitt ettettetgt ttegtteett tittigisti tittegingeg 6060 aggregatitt attateties tiegratest titgatittt teetticate attostiest 6120 6180 titiggittit tasagigitg ggsttatagg ogigagitat igogitoggt taatittace tttatututa tttatgiman tagiatitug atagagatan agagtttttt ttgtatttta sengittitt agnestigit titagitegi atetitetti tietosaggi asigiaigit 6300 tettetetan tettteesaa gytatgiega gastiaagis tittititing tittgittit 836D testiatite etitititit tiegresser tistiasist sigititite intettitt 6420 gitgogitgt tittittogt titggittgg oggigitgst gitigiatit ggnatiates 6540 ttagttatgg tgaggatttt gttttttagt ttttaggaga taggittitt ggtgggagtg 6600 tiggggtagg gtagaggtit agggatagga attaganogg attictgtig atagggtigt 6660 tinggettat gitgittatt tittitettat agteriates ataasiteta inteligett 8720 agaggagget attititit titigiangin tigginaggi titantinit agtititigi 8780 tittatggta gtittitigg stauggeggt titlestitt tgittitiga agtittungg 6840 gitggigist eggagitics agistiggit tiggostogy attgittggg titgostitt 6900 agististes tigatitett satesettia satestatti taastititt sastitiess 0393 ttttttgttt giesestgat easgetegtt tttgtittet eggettgigg tgegusette 7020 stingstong gintgigeno gitatteteg tategogitio ggintitagi eggettiati 7080 ogatgatagt igitatogtt attattetta ttagogtaga tiagggagga tigogtamas 7140 stagticate sassasses assistoris exatostits spitostate occupantat 7200 tettiesett temestetet essetateta tetettitte timietetet tetletetet .7260 etsissisti steittiga gittitaati siasacetet sursastess titosittit 7320 attittagig tietiligit tigittitti tittitgitig tgittissas ogaşeaşlat 7380 sogtgagttt ttttsagggg toggtogogt ttttttligt tttogtttig toggttgttt 7440 TARKTHARTE BASTOSTAST TITASAATTS GEATTATOGG BOSTOSTOAD GOGETTOGST 7500 ATTROCARTY STATTTRAGG TITACITTITE CARTTITITE TITELITAGA TIACITETAT 7560 TITITATTI TITGCSTTIT TITTITITC GGAAGTITTI AGGATGGTGA Ggtmaggett 7620 tettatttao getagataye aggtaayegt gittggigtt tacgegatit tittitatte ttttgtttgg gtogtttagg TGGTTTTATC GAGATTTTAG TGGGTTGGAT GTABAGATTT 7740 TOTTTAAGGG TOGAGGTGTT TACGGTAGTT TTTTGGTTCG GTTTAGTCGT AAGAATTAGG 7800 STGATTITIC STTTTTOGTT AGREGATER ELLELLERS attlograte ittlegitat 7850 tittitgigt tettiaggit tigamitelt tetititggt tittogiggt agigtigett 7820

[図31]

stitutatet ettitatit agestittag togatitite titititati titatitite 8040 tatogetteg tittatogtt tegtettite taggetgoeg GATTAGETGA TYTATATTOG GATTTAGAAT TTAGGGGATT TITATGATTT GTATGGAGGG GAGAAGTTTG CGATTTTGAT 8160 AGAGTTEGTE GAGTATTATA TITAGTAGTA GOGTETTITG TAGGATCGCG ACGGTATTAT 8220 TATITATITI AAGTATICGT TGAATTGTTT CQATTTTATT AGTGAGAGET geggetttog 8280 tattitogit stittinggt aggregateset oggittitat titugatest taggregates 8340 aggagattag tagtoggogt tatttatttt ttatttttt ttitttttgt attagttagg B400 gtttttaatg tttlttttt tigttgittt gegattiggt gttttagegt tteatttett stitititia ittestitog aggregitat aggregitet itogititat tiogggagit 8520 ttestortte taetttaget titatteras stargement tattettest gettagtate 8580 togtgtaggt tagttttgtt gttagmangt tttttttttt tigmantoga gtttgttttt 8540 tttogtttat tttttattit agtatetett aggategtga ggasttgata ttggggtgas 8700 gatggggatg astgittgit asgatatitg atgittigit tiagtogitt ogtgggatg gettigttit giggggitas singgittito ggittsasta gagetinitg agagtacgat 8820 gigangight tattigigia angightita ogitatitog gatelagagi astattitag RRRO statttttt tttstsettt tttcretttt ttttstsett ttttstsest stesstisse 8940 syttement tittenstett tittetgete tietgetitt tittagiegt ogtatitten 9000 tgitagatit ititagagia sagggtagag gastamogit agggggtitt tatatgtatt ttigggites gtogettigt tittigtogig gettitigte titetggeto ggitetiges 9120 atgatoggga attitgtitt tgttagtitg tagtittitt gagattoggg tttttasett 9180 gtattastat ttitggttas ggtattgatt gametttaga gitggettog gttacggigt 9240 agtitigies titatities agaittitit titiesatos stititita agaittitit 8300 ttittitete agtittatat gettegitto etgittatti titgittitt ttitittiti 9360 togteatett tagggggttt tiggtatoga gattititaa agtitaigit tittittitt 9490 ttitgttiit agitaggagu ggaggaogag ttgattagtg ttiggaggtg gaagagaga 9480 9540 gtagugttit aggaggttit tgtagaggag gitgaggtti gggittaagg agaagagaga ngaghgagan ggmagggagg gtagtgtogg ggogggaggt tangattagg gangtogtat tagaagetett titagastaat togettetaan agttagtatt attitigaat tiennastat 9860 gtgegaggit tilititite ggittigtig tgtttitigt titgttigtg ogtttttttt 9720 tttgogegaa titgtatite titttoggig gitttgogit tittgiggit auttigstat 9780 tigtatggag attititat titegggtit gagggaageg gittagtitt tittitogita **P840** tttggggtit tagtitgtit ttaggoggtg ggttgaagta gtttagtggg gitnggaggt

【図32】

titaggggett titoggtigg agtiatitito gegingeget gagatgggtt gegatagatt 9960 agtitititi tittititt tattitigge gitegesent tigitogitt tittitiggit 10020 titgygitga ggmanttita tastittati tiltatiitt titttegneg gagtittgig ttttttttat teogtegtti tttgiggggi tgggtittigt ggggliatag ttlittitig 10140 assonagast stattiones gamessettt agittigitt titettitam tagittitti 10200 assitogilt gastiliggs tittititta gigatattat tiagggiatt tiagsattit 10260 tistatisti tittittias tesestisti tittioetti tittiseogea soristitia 10320 10380 ttogetttgo gtittittt giittiggtt titgitgggg tatagtitta ttittisogg agatttaitt tiagittitt ittitissat attitgaata itgitagitt ittigitiit 10500 tagagetree tittegetto gangitoget tagastitte gagettagen testitgant 10560 ttgggeggte geggtigtes agagtigtes tegegtiett giettitegt tigggteste 10820 gagtttigge agttigttit agagtlagtt auggstitta ggtiegiges testagtite 10680 gogitagitt tittatitat assatggggg tastatista titagilitt agtatgittg 10740 tgagagattt aastgaggig giggattigg asgistging ogtagigitt ggintatagi 10800 aggigtitga tittoggitt titttigiga eigititigi tiegogitti tittigiggi 10660 ttgggtttta tttttttgg ogttgttttt tttaggTGGT ATTATGGTTA TATGTTTGGC 10020 GEGTAGGTAG AGACGTTGTT GTAGGTTAAG GGCGAGTTTT GCACGTTTTT TETGOGTGAG 10980 AGITITAGIT AGITTOGAGA TITICOTOTTI TITIGTETTIA GIGATTAGIT TAAGGITTGGI 11040 TIAGGITTIT CHITTAGEGT TATITATATI AAGGITATET GOBAGgtang gtagttaggo 11100 11160 11220 tigtingent timestites guttergrat tieggrages scattinget titatemets. Ettastite ettitita eggregacer tatayanten orenttiona gattitcoat 11280 AGTTTTACGG ATTTECTEGA GTATTTTAAG AAGAGGGAT TTGAGGAGGT TTTAGGGGTT 11340 TTTSTTTATT TGCGGTAGgt toggggtagg tttagtigit tttttatttt ttttgagtig 11400 ttttttagat gigagittit gggattitig agtigtigat tittogtitt tittlattit 11460 AZTOGTATTA TOTTACGAGG GTGAATGCGG TTGATATTGA GAATCGAGTG TTGGAATTGA 11520 ATAAQAAGTA BGASTTOGAG GATATAGTTA AGGTTGGTTT TTGGGAGGAG TTTGAGELEE atesteensa topptasset tyeistastt sagatestes taposettte seettittase 11640 oggatattit tittittiig titattilig titligatit attitacgig agittiticg 11700 11760 etagaigiit tiitigagag tigatgiila tilittiati tatattitag AGTTTGTASA-ACTAGRAGA GARATTEG TATTAGCCETT TEGARGETTA GCGCTTAGAG AATAAGGGTA 11820 AGAATCOTTA TAAGAATATT TTTTTTIgtg ogtatttagg tigittiatt tatttaggat

【図33】

stocktitte tittestist tittititst titsterett titettitt soutseene 11940 gagttattit titatattit tiatagagti titilititi tisasaggit titatititi 12000 ttagangigt tittitatta ttagtaggta ggttgtttit tgttittant ttittigiga 12080 attititat tittittata tagatgatti titattitig tigittatag tittitogtas gittiniggi tittgagett sgantggitt gitagittag gagggittge tittaggigtg 12160 gigagititt gettaetita gattatitog tittititto gittatitit agTTGATTAT 12240 AUTOGATIAN ATTACTION SOTTETANA TRACADROCA CORRESTITE AUTOROCIDA 12300 AATTAYATTA ASettagtag tgtgggtteo gtgggaggag eggttgggtt ttgggaattt 12360 ttigttiggt gegggmitt tegettinge getegtigge tessetogee gttgettitt 12420 tgtetgggtg agggtggteg tggttteggg tttgtgttgg gtteeggggt ttettgtttt 17480 EMERICAN ACCOUNTS AND ACCOUNTS AND ACCOUNTS ASSETT 12540 AGATITATAT CETTASTTAG EGITGTTIGG ASGITACSGT TAATGATTIT TEGTAGATSS 12600 COTOGTAGGA GAATAGTCGT GTTATCGTTA TGATTATTCG AGAGGTGGAG AAAGGTCGGZ 12660 tagggogitt titititito gialiogiti togigitigi ggitatgita tiaagtogaa 12720 gagingting atgitugget agaangaget titagagat agagituggi titigitgag 12780 agatteegen tiagtenten entitomatt atatamoste attittaest tittetatet 12840 stittigggt tilittigagt tittagattia ggittiaggt tgitittitt tittitiatti 12900 tigititati igiligiati inggittitti tigittititi igititaing attititigg agtitgitti tiettitgia agtittititi etalagiali tilligiglig italigangi 13020 gettitatto gigatatasa tigggitaan tilittiiti tiigasatti tilitatast 13080 ttttgettet ttttgggate angiogiati ttseggitte gietttangg tttggtggtt 13140 tttttttgat togtatgttt tttttgangg tttatogttt ttagtagttt tagtittttt 13200 egyttitteg tittititig talangilia tittilgita gganatgatt tittitatat 13260 tettttigtt tegtegetet tiogittitte mageitategt oggegogite titttittet 13320 goattleggt titgtttttt ttergattle gaggenggat teogtitttt tterttaogt 13380 ttittagege ggtgtttttt teggttatti gtittigiga gittitegag gtstaggest 13440 stagattere tettattigt ettisteaus tigieteett tetateetti oggegentaat stitettite stancettie tiganteata asoggateta toggiguagi settestas 13560 gtittattet tigttagige tigattigag nogagagitt aggittitig tittitigit 13620 agittattog titatitaat assigtites stocktetta satatitasa statagasta -136B0 genttiggen igggitates igtilitätti igigitilat itilattoga ittitittit 13740 THE TARGETTITAL ATTRETTORY CONTROL ASSOCIATE LASCOTOLLY VICENIA ATTRETTORY TITTGTGATT AATTGCGCGG AGTATGATAT AATCGAATAT AAATTTCGTA TITTATAGGT 13860

【図34】

TITITOGITG GATAATgiga giggittita ogittigtti tattioggga gittittiti 13920 gentitetit tittittes torestages teaseterat sasstatito sasasassas 13880 BESETATION TELESCOPE BESET TOUTH TOU 14040 ASTATTIGAS TROUTICEAT TATGEOGRET TRACTEAGET TOGGGGTGTT TITAGETELT 14100 TEGATTAGAT TAATTAGCOG TAGGAAAGTT TETTTTACGT AGGETTTATT ATGETGTATT 14160 OTACIstance atentestit tentestast astratasti succestinas tattettons 14220 14280 tgitatgagt tattataagt astateaacg ttagttogta tattgagtgt tittogitta tittoggitt tittigggit tittitatggi tittagaatti teggitggato giggitggsa 14340 tiagittiet titigettitt tettigigge tettititit agagtititt toggatgiat 14400 tettiquitt mettigite metategegg eggagitogg gattingtig tiggitaggi 14480 tteagttagt teagsteary toppgtaget etttateste smittatett togettettt 14520 ogittititt ogggettite tittettegt tittititit aggaetatit atgagetate 14580 tettititat tittititt tetttatoge tagtogtage etttogette tetteteatt 14840 tigittitt tittagittt titeggiagt gittlattit ggittitagg gitgiggg 14700 getgggigat gittittigg ggitgtetat aattittitg titalitatt ogiatgitig 14780 testioneer attitients serietores stemments toomseemes toomsettit 14820 14880 stageteset ttattemett suttigettt mustgenten gagetaging statagestt ttttogttta ttagtigtgt ggittiggat asattatita attttttaa titttagtit 14940 ttttattigi sassitagga tittagggtt gtogtgagae titsatgaga tittatogit 15000 giggitggme titiogitegt tittessaat igggogitgt tellegitte ginetitate 15060 tingstages establishes terrestite titigities stitititi stillities 15120 tegottitag gittgogace gittitggit tittittitt tittinging figitigitt. .15180 tergatages tangtogett genttingag stattitogs teggitetto sessencess tittgttitg tgttitttte gggataggit tatiltogag agitatittt ttgtttatit. 15300 gitatetete tetitatete tittitgese gittiatest tittetites mogitatess 15360 assessment statement thattities testifiest tissesties starogerat 15420 ttagggstatt agittgttgg gittagtiga gugtgggttt ggggttittt igaggittgt 16480 tigittagge tigggenogg egegenetti titetigini igittitiig egittizige 15540 ttttgtgttt togtattttg ttgttttagg gttattttt ttttgaogit agggtttgaa 15800 gganaaggga agtgangtta tgitgagaga ogtittatan ttittitung gagangongg 15680 gagggittag ggtatttggg agtoggtagg atagtggtgg guittggggg tittaggitt 15720 ticeneries eestagitat thattagene tengeneton gogogagene tenangaran maggatgets stagtteggs agttegoett agtatogtag agttogaggt ggagogtett 15840

[図35]

totgtagagt tgggtamatt tttottatta tligttoggt gattitgggt stattttttt ttattattag aggittaggt igtititigig gigtitgeng tignagitga gogttgenta tittittit oggggagggt tigatiggti titgatagta tittogtitt titttag@T 16020 COGTATOGET CUTATAGGTA TTATTATTET TATOGATATE TITATGGAGA ATATTTTTAT 15080 TAASGatase aggistitus pratiteres etopresets artartitit cretaticat 15140 ttetgtttgg atttgaggtt tgattgtttt ttatttegGT TTGGATTGTG ATATTBATAT 16200 ATECCERCE ADATECTOR TORROTTECO ATECCERCE COTARACTITA TRABARRATT 16260 ADSTRUMENTAL AND ATTACHTA COTTO ATTACHTA COTTO ATTACHTA TO A CONTROL ADARDATED ATTACHTA TO A CONTROL ADARDATA TO A CONTROL A CONTROL ADARDATA TO A CONTROL A 16320 GGTTTTGTAG gtgogtgtag agtaggettt gengerener genettgtag tetagrater 16380 gtgttattig gtittgtigg gattettatt tttttattgt ttttttgttt atagTCGTAG 16440 AAGEDTAGG ACTOGGASTA COCCATATT ATTTATTTT TAGTTATCAA CAATETTTAT 16500 GTTAAGGTTT TTCGTATTIC GTTTAAgtge gtggttttge ttgttettgt toggtettta 16560 ttitttigtt tigitlagit ogsittitat tittiggaga ggstasgigt igtagitggg 16620 gegattingt titeogitte gettigetti tiettitti tettiatese tettitites 16680 gigittateo gigigggitt tigitaggie tiagiagogi attogigist gagatetasi 18740 tittettitt taggagtite gagtitagig tagggatogi gattgogita titgigagmo 16800 suggestes sacrepatic tractutogs attitute gitettiti gattigiati 16860 sattgittgi attigittit tigisitogg tigisgATAT AAGGAGGATG TGTATEAGAA 16920 TITETATATT AAGAATAAGA GCGAGGAGAA AETGAAGAAG TADCGETTAD TAGATAAGGA 16980 GAAGAGTAAG GETTTTTTTA ADAGDAAGTG AGCGGTGTTG TTTTTACGTG GTTATEgtat 17040 agtittitig titigggigit tititigitt tgittigigt tittiggittt áttgittitt 17100 ttggglggat ggggtggtog tagttttatt tigtgttttt tagttgtttt agatttttt-17160 gtittettit teggitting tiattititi attitittat tittititit tegtegTTTT 17220 AGTTITIGATE TTETOGRASE ATTTCOCORT OGRTAGATET AYARTTIGAR TITAGGRASTO 17280 TATATETT ABITETATITE TATETTET ATOTTOPIAN ATTACATOR TITTATETT 17340 AGITTAGITA GOTTTTAGGI AGGGITAATI TITTITTITTI TGTAAATAAA GITTIBGGAT 17400 TATTgtgtgt ogtttttgag ttttttgttt gtttagtgag tgggoggtta gagggtaggg 17460 taggatgggt amtigtgigt gillitogigo gigittogog igasagitto gittittogit 17520 agaoggacut gegiogggat itogittogi ecgigagag gigatogigg gigaagitti 17580 ttagtttttt ttittamaat ggagggogat tataatageg tegttetean angintogag 17640 atgaoggtty mogatangao gegtatagty attiatiate ogtifytiat gtyttiaggt 17700 attassagat tatataogit agittagitt aggiatittt gitattitta tittatogig 17760 goggagatty aggretages quattorgia attiguttet tigtitagge tietoggett 17820

[図36]

stagastagt gaggitgage ttogasitts gattgitigs tittegagit tatettitt 17880 attitiggagt tgtagtiggg gitattitta ggggggitti gattatatti tiltigatgit gagittings titigantine gangagingt testagiogs associaset tigagging 18000 ttoggttgog ttttttttgg ogggastagg geteretttt ttegggtett ogggteogtt 18060 tagittitit tittatitag giogitgitg titttatitt titggstaga giligasgag 18120 tiggitgacg tgeagagigt tilgillill gillillit tillillita igitegaget 18180 sagattittt tittattiga aatattegig tittgeggang taangtoggt gegagttatt 18240 tittaggang tettegogit tattitigga saggitigage tegteteggt tittagagitt 18300 egnggttegg ogtgtettet ttegtenett titetegegt titoggogtt steggtettt 18380 stagttitto gattitting satitugges stiggitugg gage 18404

[図37]

ttittttgat tagttittta agittlagga ggtoggagga ttgtgaatgt ttgtgaogit susgetting tengentity tipogtanty teogettagt tittgggtit tegentitet 120 stigitting tittitinge agigggogtt agistititi gagggatgat tittatoggi 180 tttatttttt seggtetteg tetttaset sangangane tittettttt getsternung 240 sagguagagg ggatesanss tensetatit titacettag tingititit samititati 300 tengaggata agugtagtag oggittigat gaggggogga gitgggogig tiogagigit 360 tigasgasti istiliisti tiositagas sessostasi osssiissii itagsiitso 420 gittioggit gitsattatt ttitttagit tagattigga attingtatt agaggagigt 480 gattaggatt tittigaggg tggittlagt tateattita gestangene tutaggitti 540 ggggttagat agtitgggit ogsattitag tittattgit tistagtitt gigattitgg 600 gtengtgatt sagttettta gtttttttgt tttttagttt togttnoggt manatgagan tgatagaagt gittagatte aattemogte tetagtitit tegtetitge etatategta 720 agogigigat gagitatigi gitogittia togitagiog itatitoggi gittittata 780 attattitgt tatgatogtt ittitattita asganggaga tiggggagit itatitacgg 840 thattititt acgigogage oggagittog attimogito gittgmogga aggoggagit 900 titeogogag gtaogtaogg aggletatat agtiatitet titigtitigt tittiggtog 860 tttatttatt gggtaagtaa agggtttaga ggcgatatat AGTGATTITA GGGTTTTATT 1020 TATAAGAGGA GAAGGGTTOG TTTTGTTTGG GGTTTGGTTG GGTTATATAT AGGGTTAGGG 1060 AGAGETOGOG GEGATETAGT TATTTAAATT ATAAAAGAAT GEGGTATTTT TAGGTTTAGG 1140 THETEASTIT CITTATCECO AMATCITITI ATAGOSTIAG COTTGAGGET ELLEAGAGGE skengtynes gagtgagnka gtogitegan titggaggty gantangogg gittggggta 1260 gttgggaagt staggatrag gttgoggtta ttttattist ttagggagg tagtgragtt 1320 saggatatag ggtagggtag ggoggstatt taggtagang agttgtatTA TOSTTATTTS 1280 AGRAJAGTAT CETTTATTIT TITTTEAGGG AATTITTETT TITTITTTE TITGITGATC GITGITTITT TARTITTIT TITTITTET TITTAGTGTG TAGGTTTTTA TATATATTT 1500 TTTTGTGTtt gingtogget ginggreet austateret auttrutata gutterrare 1560 tagtatagge ggattoggta tiggtagttt tttttggtts titogtitta taggtgeogt 1620 egitsoggit titgiating attitusgit tituguggut egyggitete tilitatetec 1880 gagtgogttg tiggtattie giagaggitt atacgtgigg giattingga anigittate 1740 antaganger gigagestin agittigaett igengetage tittittlegt igianialit 1800 gtttttttta gasagtgagg atogggttgg gtaggatana greetegatg togggtagtg 1860 STORELINER TESTIFICATION OF STREET, SCACOASCIE CONSCIENT ASSESSMENT ATTITITALS 1920 STTSOGGGAT ASSTCATORT TICSTATTIC SATTITIOST TITTTIOCGA ELECTRICA - 1960

[図38]

aggratests aggasstart estitiagte gentlessts stattlettt tetatistes 2040 tttttttttt ttttaggitt igtttigten gietTfGTAS GATITITAST TITITTTTAS 2100 TESTTITAAT GAATTOGGOS ATGGTTACHT AGATGAATTT STATTOCGTT TICSTTTSTA 2160 TTATETTOSA GOSTTOCGIT CSTATTATIT SCATGOTTIT TTOCATETTA AYOTTATAGIT 2220 TTAGGTttax strangate stienstitt sentiteret sterscreat atcrescreat 2280 tgittattit ttattittas attittaggt gtittttatT TTTGGTGGAG ATGTTTTTTA 2340 TEAGTATUTC GATGATAATG ATGGTGTTTG TGCGCTCGAT GTCGCCGttg grgangsog 2400 suggigitat tagaggitag tiesgittit ticggenagg sengtattin gogittagit 2460 tingtitteg gististegg agtegitiga gittlingig atgegaggga atgigtiteg 2520 satistoggs taugigates tagagettis titagittis tatagatecs tittatitics 2580 ggtttigogg tgligaogit ggittittag tigitatiat tittititit titattitto gogtogatti titattitta gigagigatt giittiatti oggaagatti gagattitta 2700 astittatia tigittigio ggittitiagg tattitgagi tittitogii tittitigos 2760 ggagttatgg agogttittt agtatggttt tatttttttt tittittaga tittgaogit 2820 agggaangga tagtitigag atagtagget gogggestat agggitaggg gatitaggg 2880 agtagtgtag taggaagttt ttttttttt ttagtttigg ginnatagat ttingggaga titteggtit attittagti gagtitagta agtigatgtt tigagtogog tigtitastt 3000 tteastitag stigitmans stastititt statitatit tittititate scuttaset 3060 assignitate aggittitus gengining astatetets ingongeres stageseert 3120 agtittoggs gatgagitty tititgagag agtataggat agagtogogt titoggatag 3180 tttatogggg gtattittag atttagtoga titgttitgt tituggates stagitgitg 3240 suggester aggregates aggregatest aggregate thinogony suggesters 3300 3350 ggatoggggt saggtaggit titistititt tatititigt tigatgigag tistisasti egicategog titegittit gegggitgeo ggesttiteg tietesogut egggittist 3420 tgagtitita ogataatitt gagatittga tittatagat gaggangtig aggatiagas 3480 sagttangta attigities getteteing tigginagog gaggggittt ginittetts 3540 ttttttettt attiggatta gattagtita atgagtitet tigtgesett tttettttt 3600 titiglegitt tiatititigi attituttag agattititig attatanata igugggtaga 3660 togutogogg agitatetet agittimang magintiatt totttitate togittiess 3720 gettaggatg gestattett tegggaagtt gegagagage gtagagttag gungaagtog 3780 asgittiges ettatogats samansags magnateges agiatatett itatagatet ittiggsaga agaaattaat agaateggat ittogagagaa agongagtas iceggatata 3840 3900 getttattet gegtettet toggttitet titgatingt tiggetitek tiagtaatte

【図39】

ggtttogggt ttttttttg tatttggtag ggttgggogu getggtetat toggagaggg 4020 tittgaggas gatetiteta getegegget tesagtgegg tiggitting timogatita tttogugttt tggagttatg nggggattta ggagaagtog ggggtgggog gagggtattt 4140 astgigogag timecgitta teligittat astagittat agistitati agistitati 4200 tittegtigt tektettett etteggette tiettitiet TTGTAGTGTA COATGATGGO 4260 TITTECRICA GETAGATITI TITOTOGITO RITEATITGE TITARGAAGT TOAGGATATI 4320 TYTAGGTTTA TTGGGGGATTT TATGGTCGGG TTAGTTTAGG TATTGGTAAT GYTAGATTTT 4380 ICGAATTAGG TITTITttagg torsevatat agguttagts tittittitt tittorvasta 4440 tittattiat titattitat togettegag aggagastas gittagggag ggattitogg 4500 matgagging agogtaggag tigttatAT TETTTAGOGG GGAGATITET AAGGTACGGA 4560 OTTIGIATIC GETTETETTA TOTTITTICET ASTIGOTTAT AGAGTAGGET TTATAAGTAC 4620 STIGTATSTT TATTICGGST TAGTATGGGA CSTATTISTT tiggssegg stertogest 4BB0 suggetgage tetagagtag setattetes titatities etitiettit atettiteas 4740 tettigetat oggittaaat attigtigga tegaoggate getteetaga gagstagag 4800 stitgggtit togttitage tientimite staggiggig egetitggit agitatitie toggtatett ogtitgitat tinatusang tigtiagggt agstatigit tiogsagitg 4920 tutosattet atagtittet agetateost astetttast tigtetitit etetticear ADRO gagittatag agatagatga togggggaga tatogogtte aggagogtes ttessanana 5040 ogtantitti tittiaggit tiggaggasa taugatting atitotogng gaggtagogt 5100 ttoggtigig tittiassas ogsgetattt gitaggtaga gatagigigg agagagttat ttittegtag manetgagit tgtgtsmaga maggitggga mittgamega gitgengtig 6220 tigggegogg tgagttttta agagangogt goggattaga gagangttat teratitien 5280 stettegett ttagagtgog attituttit anngetgatt aggagttate generagatti **5340** tagenagges gynattigat tingtitgig tinoggaing guttattite atggingini agagggtgtt gtgtaggggg agtttgtagg gtaaggggta gattttagag agatttatgg 5460 entaggrage staggogges titiggatete gateggtese staggogtag garrageme 5520 gatagities sattleggit temegities assestites spatstatet egreatites 5580 ggattaogtt gigtagioga gattitetta tiagittitia gittitiaat sagggiogga ttittattit tgagattitt tittgittig gtattigati gittitogat ttaatggtat 5700 ENTERTHEE MORRESCORE STRONGERMAN RECEIVED THE THE THINTHAT 5760 5820 ATTENTCATE ETTTTAGAT AATTTTEUTT GOCSATETAG GTTTTAGCOT TITTATTAGO E880 STITAGTAGT TRETTEREN Ogtengogte gagagaogta tittangata gigagttitt

[図40]

testttasta tasetttisa attatistta tititattis tetanganet tastttoset 6000 titetttagt tettittega titagegitt tittattaga tagegaatit ttagegitt gtttttttt ttacgtggtt tatattgttg atTTTGATGT AGTTGGYATT GATGTAGTCG 6120 GATTCEGGGA TETTATTOTT TOSTTITTOT AGGATTATIC GGTTGTGGTT AAttgeggt 6180 EXECUTARES SERVICERES ESTIMANT ASTISSES TRATES DE L'ACTUAL L'ACCUSANT 6240 ttttttgagt tastaggtta tittggtttt agmagttatg aggtttgogs gagatigtgg 6300 gtagtagggg tegeggatta titgtatega gegagtegeg gagtitates gyaggitgeg agtagggggt sattigting thegheries graggistit theggaggag ingaggithi 6420 tisgaguage segassitit signgessig tempgaguts stittitits sosignagus 6480 tagagattig igagatgaga saasstagtt gargtagga ogstattitg gatgaatgag 6540 gtegtttggg tgttatAGG GGAGAATGIT TITGTAGCGG TITTTGTTTT TETTTTTTEE 8600 TOGTTOTTET TITAGACCIT GOTGYANGIT TITTATTITT TOTTTTETA AATTELEGE 6660 tetsestess genetages thegittite esgaggitat thatogogy estiteogiy 6720 gesteratte genetarare teretackee generalite thoutities sittlessto 6780 gligitatie tilitagligt titaglittig toggittitia timigiatil TAAATTITTI TTABAAGITA BITTIBBITG TATTITCGBA TITTTBITTI TIGITTABIT TIAATATICB 6900 SITTITAATO TYAGTOSTAT TATTTTOST GOTATAGTAD GOTLEGGELE GERANGOOD ROAD agangitagt sattingage titingangt tietatitigg gggatagiti aggagengig 7020 aggaggtagt tgggtttatt tttgatTGT CGTAGGTAGA TAAAGGCGTT TGAGGTTTTT 7080 TTAATTTICO TTITTTIBAA ATRITTTATT AGRITGGGA GGTTGTCGAA GGTTTTTAAA 7140 TTATTTATTO TOTAGCOTTT ATTELEGERS SASTLABALL ASSILLATION INSPECTION gttttttttt tigggttttt agtttignat tinngiting gingnititt titgttatit. 7260 statistizat tatagategy extitizate garettitit ogtoritize tigittistT 7320 TOUTATATOA TITTEATOTO GETEATITTE AGCOGGAAY TEGOTTAGT TITEGETTEE 7380 TTATTGAGTA TAGAAASTAG GAAGTTTTTA GGTTGGTTGA GGTTTTTAGG TATAASAAAC GTTTAGGGTT CGTTTTTOGT TTGTAGTAGT GTTTTTETTT GTTCGTTAGA TATETGGTTA 7500 TEGTATTATE togagangge agogttages saggtaggat teaggttate suggentrop 7560 7620 ttgagtagag atattiatag agagegetog gesattaagt atttattgig tgttaggist tgogttatet gittitaast tiattatiit attinggitt titetesate igitgagagi 7690 taggiatgat attattitta tittatagat gaggamette mogitigagit attattitett 7740 ggittegggt tittgattga tittagggta agtitttage gtittgitgt ttaggtigga gtgfagtage gegettateg tittitgtag tittegatitt ttaggtiten gtiattitag 7800 7860 tittingagi titaningg titogantii agagtitati titganaggi aganaggitg

【図41】

gtantattte mestatting aggagagang thouggaige ottitogiga aggatgagat teigtiting tegngating agglessges seacglegat ogegetiate tisingggag 8040 testesses tesetatata gatttaustt stenssunge ceneturest scatttosit 8100 auguaguoga spaagataat titattouru aaagagtest stassussit tiguagtett 8160 ttggatgatg ttattgmage gengtttage gittemacogs atttgaagge gitgitagge taguanging antiangtit tittitogan ginistitit tittinggan gammitging RORA titiatuang titagitita taggamatta ogigatagna sanntatena stitititia 8340 sugagagagt gagaastgag stigigaggt tittitagtt tagggacgag gegagagagag 8400 stanattitt testogtage gatgegagga aggaggagag gattagtite tittestite ttttetttt gttoggeggt gettitegto gegogettt toggettitt toetttiett 8520 gggttatttt agtttatogt tiggggatag attaggattt taggtagogg ggagggggtt 8580 gogttttttt tittaggttt toggatgage augttittat etaestetta getteattet 8640 aggaegogta gagttatoga gggatagatg taaattttog tagaggagga ggogtataga 8700 tonggtagag gatatagtag muttigggag anngagtitit tietoiniti tinggiting aggigetett agtittiggs acggettatt tessaggett tittagtgogs tittitiggt 8870 tttaattttt ogtttoggta tigtitittt ttttttttt ttttttttt titttttta 8880 atttaggitt tagttttitt tgtaggggtt tittggggtt ttgtttttt tittlatitt 8040 taggtattee ttagttogtt ttitttttt egttegaget noggogonng ngaggatatg 9000 ngittingng metitoggig tiansangtit titgngigtt goggiggage agaggangag 9080 tagggegtag stanggagtt agitatgige getttatuge gegagggeng gittigsagg 9120 sgrtogettt aggenogges gittittagg ignettetag gettetatog ignicenati 9180 tagtitians titlesting tettinett assantaits sigtagiting sagettomas 9240 ttttagagag ettetaagit getoggagta agyttttoga ttatitiaat asiogattia 9300 tgantgtagg gutttacggt augggtaugt cggtttggtt tuggggtgtu tgtganaatt 9380 ttttagogtt atttogtigt tttttatttt angagggettt getettgaga tecepttett 9420 granggraft atggigttet gaggagtatt tagagttttt agittitagt ttatgttttt 9480 segngattat aggaggagto ggggoggtta tagganggna atgittggag tattattitg tettogerat ogogtgagat attitatata getgaatati tiotatogig tittiaatga 9600 tttttettix gatoggagat ttatttgatt ttataggata gatttatttt tacaggagga 9660 tigggatang gintlengig tittgginng tettintit toititiatt tingigites 9720 titittatta tittaatata tattaasata asassatasat asassangat asattogott ttagaggaag magagttttt tantastaga gttggttigt mogatatgtt gettattagt 9840 agtestitt tigtitting teggattige gitgiagoge tiaggettit oggastages 9900

【図42】

ogggatestt tittetestt tittosgust tagstessen gegtestese tierettite 9960 agotattaga tittaggata stagggagga segatatten gagtittagt tegtetagge 10020 aggagaggag atgaaggeta sytagtette ettettagit tittigitti titigettett 10080 tagustessa storettiat tittigittes saatesoges estsogeast tittatiiii 10140 TATTAUTOGG ATCGCARTAG TITACCGCGT ATTTGAGGTG GATGATGCTG TCGTCGCGGT 10200 TITETAGOAT ATTITETET TOAGTETAGT ATTITATIAG TITTETTAGA GTOGTAAAIT 10260 TITITITITE ATATAGGITA TAGAAATTIT TIGAGTITIG GATICGAATA TGGGTTATIT 10320 CATITITAT Tetgtagggt attaggoggt gaggttagto ggtgtaggog taguggtagg aggstagesa toggttgagg tittigggtgg gggtatatat gggtatgggt gggtatagat 10440 aggratures agisteness tiesussian aggratagat execusitor tatisticus 10500 augusttage autgagtigt ttagggittig gatggtates gagugtggit susstigting 10560 SESTIFICARE SESTIMATE STITCAGGGA GAGCGAGAAG TTATTTTGGT TITTGCGATT GEGITTOAGIT AGGAAGITAT COTGOATATT TCGGTTTTTG AGTAGGGTTT TTGTATTTAG 10680 TITATIGAGG TITCGGTGAA ATTATITERE CERTITERET RESETARIER FRANKERETET 10740 cetegetett aggistlitt attititett tatoeteget estaggitt tatTTTATTA 10800 TTTT00000T TTTC5GAGAG BAADO85GCB TAGSBAATEA OQAOCTOTAG TTAETTT5556 10860 TAGGTAGAGA GITTAGGGAT TAAGITITAG ATGTAGITIT TAGTGTCGGG TCGTTTTATT 10920 ATTITOGETO GITTIAGITI IGGGGTTGIT ATTITATTEE tttggggtag toggtagggc 10000 ERRESTERRE ERREGORGES togettittt providentit attigtatit tiogtities 11040 aptatagten gggengagen gtagngtage etgetatter regtagegeno gjegtttatt 11100 tittataogt tiginatten aggittagga gtatggiett gistatetetgi gainetatet 11180 gingineges tatatgigig.tttigiatet titiaggille getentattt teogratgog. ..11220 satitagang gittitanggi attitititi tititating tigititiso giagtititi 11280 tiggitiacy tinetnetes testagoget estastigit storagions tiligitums 11340 tgtogggogt tgtgttataa tggogtttat atgttttgtt tgottggitt tttatiotag 11400 ttttatgama taggggitat tittattatt ttatagatam gganttigam mittagggam 11460 tittangatat tetitgagit tattagtgag ttagttgtag tettaggatt tanatitags 11520 tagttogett tiessettes tetttisest tittetetet tagtitities setttieses 11580 antogogati negagititt tigittaneg gugtigitet gggngtagga gattastagi 11640 teagetttty timetetty teagegages gggtgttttt tittestice teletytest tigittatet tatigiggie gegggatgge testatgett tigagiegit tigitesini 11780 aggittitti testittist ittisagitti tigittigit tiagigitti tattaggera 11820 titatititit gggggtiggg sgataaggit titattetgg tigattitit tegggtiggt 11880

[図43]

tgattitaga ggttttasat attasggtat etgatgttgt ttattigtas tittasatat 11940 esatetteat atogitzeat tesanogage managiagit tentegeren intelagean 12000 statatatte stystiitit tingsgares naatteeste stiggaggat aggetteese 12060 gogotottig giittitata tattititig enigitatat gaigggiate tattattitit 12120 stangates stateticat texpestest titterroom tititegent stareroome 12180 ttttttgitt ttmittggat gitgittgte teggigtgte tensogigse gitggtoggs 12240 ogtagteett taogitteta attitagtat titregesent tasastisso seattacear 12300 gttaggagat ogagattatt tiggitaata tegigaanit tittittiot taanaatata 12360 sessesting tiggetates testaggoet tigtestitt estiations gengitemag 12420 taggagastt attigastit aggangtoga gettgtagug agttangatt atattettet 12480 attituatit primatatar tangatitta tittunouna nonconnuna teraptters 12540 tigigigitit maintitiate maintitatet atgittigit tieggiomen gragmannen ttttaugtit autaugtite attttttat gataatista tiettetitt tagaaatatt 12660 assistiast stittittt assassarett tilltelitt tilttettt ttettetti 12720 attigittit ggittitti tittatiggt gittigggga attigittgg tgrgittati 12780 giatggitta gittigatta tittittagi tiggataita tittegagit toggasetto 12840 gogganttit taogittaso gitaspragi sagaagagta taigiasagi tagitatago 12900 gogggotatt ogtiggogit tiogittatt toggagigtt tagagittag tecgatetti 12960 ggtattgagt sagtgtitas tanatnagtt cattagtita tagttatata titggttata 13020 agintegtti titggittin tatatetagi tigtitgita taogteggia egggigiata 13080 tatagitista giatatatat tittettatit atgittatit atatatatat tiggitoggi gistatititt acgistggss tatesettig stistatog segittings titatgtits 13200 stationace titettetat titestitita againtititi titeseetti santitatti 13260 ggtgggaagg aattaattog gtattieges ganatiestt aggtattitt tittgstite 13320 tegengaget appraisitt tignappete tiongitung agetageatt togetageng gtatagttit tgttattitt tggtaggasa etassanett attittttta ttttggtatg 13440 stategesett tetagattat tittetatat accentitiat itegetitia satastitis 13500 tgatgtagga attattittt ttattittit sigggoggaa staagogtag ggagsitang 13580 astiniam giasatgiti gainstiing magaansaan tettitiin ganginggon 13620 gotnessgie gegetteegg tteggogteg tggitteogt tigteettit egtettitgi secretaria tigriguati attigatati aagtitunga stastitung santitusas 13740 assittigit titutossas statement testimorio instastate tittigiasi 13800 titagetatt tergagatig agategrage atogittene titerestes togagettet

【図44】

agteauttat getigigits tighasitog gitteggigs tagagigage tilitattita 13920 assenteens stategitgy gogtegigst tistatitgt satitiogia titigggage 13980 togaggtegg aggattatit gaggttagga gttogagatt agitgggtas tetagtegan 14040 ttttattitt attagtitgt antittagtt ttttaggagg tggaggttgt agtgagtoga 14100 gattatgita togtattita gittgggtun tagugtung titogittin ananananan 14160 antissessi tatatagatt sagattante signistance sagatagata stiturango 14220 gionstange teasatestt igingenngi illiggentig tilligegitt ingestitto 14280 gttigatean tgagttient anintittit mentattgat gtgannagtt gginngtest agggilling igitgitagi tittatatta taltattaat tittaggita attitatita 14400 giaggigita titattisat titagasata geneticasa titagasata tinaginati 14460 gittaugutt ataagttagt gagtaggaag gtgggtanna tanggttgtt agangtngga 14520 gttiggtett tttttttta atastistat tgtagtagat agogtoggge gtagategga tegetattet tataettiat enternaget generaagen etettittit agaegianie 14840 tegettegge temagaggig giacottotag agittatate ggtogtgttt agitogtgagi 14700 angitatety ettreasion ogitatitis agareteese attitutist agasestat 14760 tteaggitag gitgagasat teaggatgas attigtetta gyggaggitt ggitaagita 14820 titiggiagen annigatiot aganggratit agggatiaga agatitogia gynatitiat 14880 orriganeto entagtenta agatetetat terretagre etagataten etetpapuar 14940 teagesttag taggettage gauttettta ittateamit cettagtett tigtaggtag 15000 gtigitatit tittititit tittititit tittigagat geagtititt togifetati . 15080 taggitggag tgtagtgaog tastttoggt ttattgtaat tttogttttt tgggtttaag 15120 testititit gittingtit tillagtagt teggesthat negtgogtat tettgigtha 15180 gittaatitt tilltigist titlagtiga gatagggitt tattatgtig gitaggligg 15740 tittgaatit tigatitogi gattiattig tittegattit tiasaatati agastiatag 15300 gittgagita ttatgittag toggitgita ttittitti tillitioga toggitgita 15380 terretter terretter terrettes attracture attractive attractive 15420 THISTITE CONTROL THISTITE CONTROL TO SECRETE STREET 15480 TETETETE TETETETE TETETETET TETETETET TETETETET TETETETET 16540 tttttttgat atagasittt gittistist tinggitgas gigtagigit singiliant 15600 ttettgtego glogattitt tiggttiagg tgattitttt gitttagtit tittagtast 15660 tragattata getgtatett attatattia ettattiatt agtagtaata stagtogtag 16720 togteginge gatgaggitt tittttatgt tgiltagggt ggittigaat tittigggttt 157B0 ongignitti titattitag tittitaani igiinggati nitatatgit iggattatin 15840

【図45】

tatitagtat tittittiaa tagagutggg gittititat gitgittiag tiggittiaa 15900 stittigagi tiangtasti tittititto ggittittas agigitgaga tiatagaegi gogitattit attiogitag gittitatti tisatattit agittiaata iggittasti 15960 16020 igligiggit tigilitogi titattaggg tittitigita ogggiatati gtittititi 16080 tgtligtttt tatattaggg tttigtgtit attatitttt ttgtttagag etgtliggit titigattati acgitatatg gitagittit tittittitt attogggitt tagittamat 18200 gitattittt oggganggit tiltigatti tittagitag fantgitatt igistattin 18260 gitetitett agiatatgan gitggittat tittititt tittilitt itgagataeg 16320 gttttatttt gtogtttagg tiggigtgta giggigtaat tatogtigat igingittig attititage titaagtaag tittitatit tagtititit stagtiggan tintaggang 18440 tgtgttatta tatttagtta attititatt tittgtagag stegggittt attatetteg 18500 ttaggitggt titamattit igggittang tantititit gittingtit titatagigt 16560 typesttata gytytysatt attatettog gtimagetty titottitti goginatott 16620 tttgagsatt tgisatgatt tenttiattg ggitattigt toggittgia attitttatt 16880 ggaatgtang titogtyago gtagagatta tgtttgttit gtitatitta gtattattag 16740 tettitasat agtattiggt giataataga tettitastac stattigits satgastest 16800 gteggggen gggnegtyen eggmentenn gangatgggn thanngtity styttgggan 16860 gigoggagna gitggitgga ogigggaggg tittlogoggg iggittitga itgitatgit 16920 transtatte transtatt aggregates stittaagta grasstages staggagtit 16980 agenetteen agtogonate testegages antagateta tettigitta suggamente 17040 thouseness agendades tatgagedes towassett thatetitte offensess 17100 sagittatas gratograsa taggogtase stagogetas atogtatita ogittatata 17160. ogtoggagtg agtattanta aagttttttt titttitama sitaatagga gattaggatt toggatggtgt togggattta tytacgogat AGTATTTTT TGTAGGAGG GGGAGATTAC 17220 17780 GOCGOAGOST CSTAGGGGGC GOSGTTGAST TAGCOSTATA GITGTGTATA GIBSTITAAS 17340 TRADITION ASSAUTO THE TANTANT TATALETT TECONTITUE THE TECONOMICS TO THE TENTAL TRADITION OF THE TENTAL 17400 TAATgetatt gingggaten ettitiggett antegtittt aggnanegge tegetgegge 17460 surgitigati operatogit totagoggit agtititite tegtitiese gogggagtet 17520 satesattes titatiggit taggetogit tittitegga egeggeggeg tiatitiggar 17580 ttttatttgg agtttaggtt gatagagogg ogggstattg ggtaggugan tegettagga 17640 agiantitis gitengrang agiantical gaugement tittogiage organettes 17700 aggettteng generatittt nategitteg tillttagag naggaggiet tittletate 17760 sgittattta tttagggogt tgagggatti attitagtti tttaattigi ttogggggam 17820

[図47]

(a) Wild type DNA

5' -AGCTCGCGATGCCAGCTCG-3' sense strand
3' -TCGAGCGCTACGGTCGAGCGAGC-5' antisense strand

(b)

Bisuilited

5' -AGITCGCGATGTTAGTTCGTTCG-3' sense strand
3' -TTGAGCGCTATGGTTGAGCGAGC-5' antisence strand

(c)

FW primer 5' -AGTTCGCGA

5' -AGTTCGCGATGTTAGTTCGTTCG-3' sense strand
3' -TCAAGCAAGC-5' RV primer

3 -10AAGGAAGG-0

(d)

FW primer 5' -AACTC6CGA

3'-TTGAGCGCTATGG<u>TTGAGCGAGC-5'</u> antisense stran 3'-<u>TTGAGCGAGC</u>-5' RV primer 【図46】

sessesset titagetass stiegettit speciasset insetitest insentials 17880 assessed attraces eterestic generators resentiare reagrapses 17840 tgggggttgt taggttogts agagsttgat atteaggtts agitateggo gtatttatte tigitigges tatleaggit tittititit iggiegiggt staegggegg gitsettiti 12080 aggaggoggt tacgtigtts tiagtogtag gittateggg tegtagggtt sigggoggta 18120 generategogt tittegtite titteateget tegeogetitt aggettitge gittogtage 18180 attigation gogagioent tienggatet tigiongegg gagtggengg tienttittt 18240 ttttmagget tegogtgitt segsteitig geggggsigg tegittmagt atgantigit 18300 tttttattes tterstegit gittgitess teggeogist gteggittit gittogists 18360 stitusates testatites titatettes statesting ates

[図48]

(m)

REP-S1: 5' -CAGGCCAGTGGAGTGGCAG-3'

(b) ... REP-AS1 : 5' -GAGGAGGTGCAGCTAGTCTG-3'

(c) (#7441)

CAGGOCAGTGGAGTGGCAGCCCCAGAACTGGGACCACCGGGGGTGGTGA
REP-81 Hoall

GGGGGCCGGGACTGGGAGCTGCATCTGAGGCTTAGTCCCTGAGCTCTCT Hpall

GCCTGCCCAGACTAGCTGCACCTCCTC (#7566)
REP AS1

【図49】

(**a**)

REP-S2: 5'-CAAAGCACTGGCTTTGGAACC-3'

(b)

REP-AS2: 5'-ATCGAGTGAGTCCTGCTGGAT-3'

(c) (#6858)

<u>CAAAGCACTGGCTTTGGAACC</u>GGACTGTCTGGGTTTGAATCCTGGCACTG REP-62 Hpa II

CAGCTGACTGATGGACTCAGGCAATGCCTTAAACTCCCTGAGCCTC

AGGTTCCTTGTCTGTAAAATGATAAAGATAGCCCCTGTTTCATAGGGCTGT

GGTQAGAAACCAATCABACAAGGCATGTGAACGCCATTATAGCACAGCG

CCCGGCATCCAGCAGGACTCACTCGAT (#7084) Hps II REP-A82

•

[図50]

SHP1-PF1: 5'-TGTCTGGAGGCCACGGTCAATGA-3'

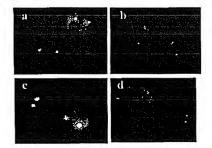
SHP1-PR1: 5' -GTTTGTATTCGGTTGTGTCATGCTC-3'

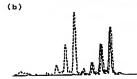
[図53]

(a)

FISH analysis of ILTMot and NK-YS cells with chromosome

	positive signal No.(%)												
cells	probe	0	1	2	3	4	more						
ILTMot	Сь#12	1	1	97	1	G	0						
	SHP1	1	2	95	1	1	0						
NK-YS	Ch #12	0	0	99	1	0	0						
	SHP1	1	3	91	4	1	0						





Microsatellite marker	LOH
D12S356	15/19 (79 %)
D12S336	6/16 (38 %)

【図51】

(a)

SHP-LF1: 5' -CCCAGTTCATTGAAACCACT-3'

SHP-LR1: 5'-CCTTGCTCTTCTCCTTGTCT-3'

【図52】

(a)

MF2: 5'-GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC-3'

MR2: 5'-TCACGCATACGAACCCAAACG-3'

(0) (#7037)

<u>GAACGCCATTATAGCACAGCGCCC</u>GGCATCCAGCAGGACTCACTCGAT MF2

GCSTAAAAGCAGCTBGTGGAGGAGGGABAGATGCCGTGGGAC<u>CGTCT</u>

GGGTTCGCATGCGTGA (#7195)

フロントページの続き

F 夕一ム(参考) 4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ33 QQ43 QQ53 QQ62 QR08 QR14 QR32 QR50 QR50 QR62 QS11 QS16 QS25 QS34